

**Untersuchung physikalisch-chemischer
Bestimmungsgrößen der Basenpaarung von
Guanin und Uracil in Modellnukleotiden und ihre
Anwendung zur Strukturaufklärung ribosomaler
RNA**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Josef Stulz
aus Singen a. H.

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Untersuchung physikalisch-chemischer
Bestimmungsgrößen der Basenpaarung von
Guanin und Uracil in Modellnukleotiden und ihre
Anwendung zur Strukturaufklärung ribosomaler
RNA**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Josef Stulz
aus Singen a. H

Dekan: Prof. Dr. K.H. Bauer
Leiter der Arbeit: Prof. Dr. Th. Ackermann
Referent: Prof. Dr. Th. Ackermann
Korreferent: Prof. Dr. H.W. Zimmermann

Tag der Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses: 02. JULI 1981



Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Determination of base pairing in Escherichia coli
and Bacillus stearothermophilus 5S RNAs by infrared
spectroscopy

B. Appel, V.A. Erdmann, J. Stulz, Th. Ackermann

Nucleic Acids Research 7, S. 1043 - 1057

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1977 bis März 1981 unter der Leitung von Prof. Dr. Th. Ackermann am Institut für physikalische Chemie der Universität Freiburg, Lehrstuhl II, angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Th. Ackermann danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie sein stetes Interesse und die Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. V.A. Erdmann und Herrn Dr. B. Appel danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit und die Bereitstellung der ribosomalen RNAs.

Herrn Dr. R. Römer danke ich für die sorgfältige Aufnahme der NMR-Spektren.

Herrn Dr. M. Grubert und Herrn Dipl.-Chem. G. Messner danke ich für den Bau der elektronischen Speichereinheit zur Aufnahme der IR-Spektren, sowie für vielfältige Hilfen beim Erstellen der Rechnerprogramme.

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Klump danke ich für die Einweisung in die Bedienung des Kalorimeters.

Herrn Priv.-Doz. Dr. H.H. Limbach danke ich für seine Hilfsbereitschaft und viele nützliche Diskussionen.

Frl. D. Hartenthaler sowie ganz besonders Herrn W. Wangler danke ich für die gewissenhafte Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten.

Meiner Frau Jutta danke ich für die sorgfältige Anfertigung der Reinschrift dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Physikalische Chemie danke ich für ihr freundschaftliches Verhalten und ihre Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1.	Einleitung 1
1.1	Die Funktion der 5S und der 5.8S RNA 1
1.2	Die Strukturaufklärung mit Hilfe physikalisch-chemischer Methoden 3
1.3	Die Basenpaarung von Guanin und Uracil 6
1.4	Aufgabenstellung 7
2.	Material und Methoden 8
2.1	Substanzen 8
2.2	Synthese der Modellverbindungen 9
2.2.1	Säulenchromatographische Trennungungsverfahren 9
2.2.2	Adenyl-yl-(3'-5')-guanylyl-(3'-5')-adenosin (ApGpA) 11
2.2.3	Oligonukleotide mit einem endständigen Guanosin 15
2.2.4	Polycytidyl-uridylsäure (Poly (C,U)) 17
2.2.5	Die Polynukleotidkomplexe 19
2.2.6	Basenanalyse 20
2.2.7	Gelelektrophorese 21
2.2.8	Die Bestimmung der Stöchiometrie der Komplexe 22
2.3	Konzentrationsbestimmung 26
2.3.1	Phosphatanalyse 26
2.3.2	Optische Konzentrationsbestimmung 26
2.4	UV-Spektroskopie 28
2.5	IR-Spektroskopie 28
2.6	NMR-Spektroskopie 30

2.7	Kalorimetrie	32
2.7.1	Beschreibung der Meßanordnung	32
2.7.2	Probengefäße	32
2.7.3	Auswertung der Messungen	34
3.	Ergebnisse	38
3.1	Die IR-Spektren von Modellsubstanzen für die nicht basengepaarten und für die in Form von Watson-Crick-Basenpaaren gebundenen Nukleotide	38
3.2	Charakterisierung der synthetisierten Oligonukleotide und der kopolymeren Polynukleotide	40
3.2.1	Oligonukleotide	40
3.2.2	Polynukleotide	41
3.3	Charakterisierung tripelhelicaler Komplexe von Poly U und guaninhaltigen Adenyloligonukleotiden	44
3.3.1	Die Stöchiometrie der Komplexe	44
3.3.2	IR-spektroskopische Charakterisierung der tripelhelicalen Komplexe	48
3.3.3	Kalorimetrische Messungen an den tripelhelicalen Komplexen	50
3.4	Die Basenpaarung von Guanin und Uracil	53
3.4.1	Der doppelhelicale Komplex Poly (A,G) • Poly U	53
3.4.1.1	Die Stöchiometrie des Komplexes	53
3.4.1.2	IR-spektroskopische Charakterisierung des doppelhelicalen Komplexes	58
3.4.1.3	NMR-spektroskopische Messungen an Poly (A,G) • Poly U	70
3.4.1.4	Kalorimetrische Messungen an Poly (A,G) • Poly U	71
3.4.1.5	Zustandsdiagramm und zusammenfassende Beschreibung des Systems Poly (A,G)/Poly U	83
3.4.2	Der doppelhelicale Komplex Poly G • Poly (C,U)	86

3.4.2.1	Die Stöchiometrie des Komplexes	86
3.4.2.2	IR-spektroskopische Charakterisierung des Poly G • Poly (C,U)	88
3.4.2.3	NMR-spektroskopische Messungen an Poly G • Poly (C,U)	94
3.5	IR-spektroskopische Untersuchungen von 5S RNA und 5.8S RNA in Lösung	96
3.5.1	Der Einfluß der GU-Basenpaarbildung auf das Spektrum	96
3.5.2	Die Analyse der IR-Spektren	98
3.5.3	Vergleich der Ergebnisse mit vorgeschlagenen Strukturmodellen	106
4.	Diskussion	115
4.1	Die tripelhelicalen Komplexe	115
4.2	Die GU-Basenpaarung	121
4.3	Die räumliche Struktur der 5S RNA und der 5.8S RNA in Lösung	130
5.	Zusammenfassung	141
6.	Literaturverzeichnis	143

1. Einleitung

1.1 Die Funktion der 5S und 5.8S RNA

Über die Funktion der ribosomalen RNA gibt es bis jetzt nur einige Modellvorstellungen.

Die Zellorganellen, die bei allen Lebewesen zur Proteinbiosynthese dienen, sind die Ribosomen. Sie sind aus zwei Untereinheiten aufgebaut, die nach ihren in der Ultrazentrifuge bestimmten Sedimentationskonstanten 30S- und 50S-Untereinheiten bei Prokaryonten, bzw. 40S- und 60S-Untereinheiten bei Eukaryonten genannt werden. Bei der Proteinbiosynthese lagern sich die beiden Untereinheiten an die messenger-RNA an.

Während das Schema der einzelnen Vorgänge, die hintereinander ablaufen müssen, gut bekannt ist¹, fehlen wichtige Detailkenntnisse. So ist beispielsweise der genaue Bindungsmechanismus der t-RNA an das Ribosom ungeklärt. Die Sekundär- und Tertiärstrukturen der ribosomalen Proteine und Nukleinsäuren sind weitgehend unbekannt.

Die meisten Kenntnisse über molekulare Ordnungszustände der ribosomalen Nukleinsäuren besitzt man über 5S und 5.8S RNA, die wegen ihrer relativ kleinen Molekulargewichte leichter zu untersuchen sind, als die wesentlich größeren 16S und 23S RNAs bei Prokaryonten, bzw. 18S und 28S RNAs bei Eukaryonten. Beide Nukleinsäuren sind Bestandteile der großen Untereinheit der Ribosomen. Während die 5.8S RNA nur in eukaryontischen Ribosomen vorkommt, ist die 5S RNA sowohl Bestandteil der eukaryontischen als auch der prokaryontischen Ribosomen².

Inzwischen sind die Primärstrukturen von 16 prokaryontischen

5S RNAs, sowie von 24 eukaryontischen 5S und 9 eukaryontischen 5.8S RNAs bekannt³. Bei Sequenzvergleichen findet man wesentliche Unterschiede zwischen prokaryontischen und eukaryontischen 5S RNAs. Während die eukaryontische 5S RNA ein primäres Transkriptionsprodukt ist⁴, und deswegen ein Triphosphat als 3'-Ende besitzt, werden die prokaryontische 5S RNA und die eukaryontische 5.8S RNA aus größeren Molekülen durch enzymatische Spaltung gewonnen².

Rekonstitutionsexperimente von prokaryontischen Ribosomen zeigen, daß beim Einbau der 5S RNA aus unterschiedlichen Prokaryonten die Funktion erhalten bleibt, während der Einbau von eukaryontischer 5S RNA in die Bacillus stearothermophilus 50S-Untereinheit nicht gelang⁵.

Alle prokaryontischen 5S RNAs enthalten die Sequenz CGAAC. Sie ist komplementär zu der in den t-RNAs vorkommenden Sequenz TΨCG. Die Vermutung, daß eine mögliche Funktion der 5S RNA darin besteht, die t-RNA während der Proteinbiosynthese zu binden, wird durch die Beobachtung unterstützt, daß das Oligonukleotid TΨCG die nichtenzymatische Bindung der t-RNA an das Ribosom verhindert^{6,7}. 5S RNA ist in der Lage, TΨCG zu binden, wobei die Bindungskonstante noch erhöht werden kann, wenn 5S RNA-Proteinkomplexe verwendet werden⁸.

Eukaryontischen 5S RNAs fehlt die Sequenz CGAAC. Da auch die Proteine L18 und L25 aus Escherichia coli Ribosomen, die spezifisch an prokaryontische 5S RNA gebunden werden, keine Wechselwirkung mit eukaryontischer 5S RNA zeigen⁹, kann man annehmen, daß die Funktionen der beiden Nukleinsäuren verschieden sind. 5.8S RNA hingegen bindet beide Proteine und

könnte somit in eukaryontischen Ribosomen eine ähnliche Funktion übernehmen wie die 5S RNA in prokaryontischen.

1.2 Die Strukturaufklärung mit Hilfe physikalisch-chemischer Methoden

Die räumliche Struktur der 5S und der 5.8S RNA wurde mit verschiedenen physikalisch-chemischen Methoden untersucht. Die Ergebnisse sind sehr unterschiedlich und reichen von 28 bis 50 Basenpaaren für die 5S RNA, sowie von 40 bis 60 Basenpaaren für die 5.8S RNA. Deswegen ist es bisher nicht gelungen, eindeutige Vorstellungen über die Sekundärstruktur zu gewinnen. Besonders die NMR-Spektroskopie^{10,11} und die Gleichgewichtsdialyse mit Oligonukleotiden^{12,13} weisen auf geringe Basenpaarzahlen in der Sekundärstruktur hin. Sehr wahrscheinlich sind die NMR-spektroskopisch gefundenen Zahlen wegen der schlechten Auflösung der Spektren zu niedrig. Die zur gleichen Zeit von den gleichen Autoren durchgeführten Messungen an t-RNA ergaben nur die 19 Resonanzen, die nach dem Kleeblattmodell zu erwarten sind¹⁴. Spätere Messungen bei höherer Feldstärke und besserer Methodik ergaben 26 Resonanzen¹⁵, wie sie nach inzwischen vorliegenden Röntgenstrukturuntersuchungen zu erwarten sind¹⁶. Ähnliche Probleme sind mit der Methode der Gleichgewichtsdialyse verbunden. Sehr kurze Segmente der Sekundärstruktur können aufgebrochen werden¹⁷, und auch schwache tertiäre Wechselwirkungen sind nicht mehr zu finden.

UV-, CD-, ORD-¹⁸, IR-^{18,19} und Raman-Spektroskopie²⁰⁻²² auf der anderen Seite deuten auf hohe Basenpaarzahlen hin. Bei diesen Methoden können jedoch Unsicherheiten durch die fast immer vor-

liegende Existenz einer Tertiärstruktur auftreten, die nicht richtig erfaßt werden kann.

Die IR-Spektroskopie wurde mit Erfolg bei der Strukturaufklärung der t-RNA eingesetzt. Nach einem Verfahren von G.J. Thomas²³ werden aus den Spektren der Mononukleotide und der doppelhelicalen Komplexe von Poly A·Poly U und Poly G·Poly C die experimentellen Spektren simuliert. Da aus der Sekundärstruktur der t-RNA vermutlich der größte Einfluß auf das experimentell erhaltene Spektrum resultiert, ergibt der gewählte Ansatz gute Ergebnisse^{19,24}.

In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Vorschlägen über die Sekundärstruktur der 5S und der 5.8S RNA. Soweit sich diese Vorschläge auf E. coli und Hefe (Saccharomyces cerevisiae) beziehen, sind sie in der folgenden Tabelle I aufgeführt.

Tabelle I: Vorschläge zur Sekundärstruktur der 5S und der 5.8S RNA

RNA	Autor	Referenz	AU	GC	GU
<u>Escherichia coli</u> 5S RNA	Brownlee et al.	25	4	16	3
	Boedtker et al.	26	8	24	5
	Cantor	27	14	32	3
	Raacke	28	6	21	4
	Madison	29	9	23	7
	Jordan	30	9	19	3
	Du Buy et al.	31	9	25	6
			8	24	6
	Monier	32	9	25	6
			8	22	3
			7	22	4
	Kearns et al.	11	7	20	1
			4	16	1
	Fox et al.	33	5	17	3
	Österberg et al.	34	9	27	6
	Weidner et al.	35	5	17	3
			4	12	1
	Luoma et al.	20	10	21	5
	Hori et al.	36	5	17	3
	Chen et al.	22	35% A	70% G	...
Hefe 5S RNA	Hori et al.	36	9	12	2
	Luoma et al.	21	13	16	5
	Vigne et al.	37	9	12	2
	Nishikawa et al.	38	14	19	4
Hefe 5.8S RNA	Rubin	39	16	16	4
	Van et al.	40	23	21	4
	Luoma et al.	20	24	23	8

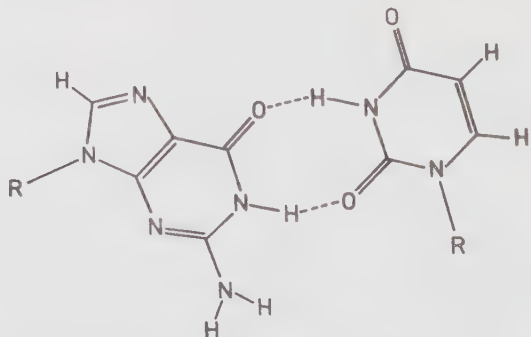
1.3 Die Basenpaarung von Guanin und Uracil

Vergleicht man die verschiedenen Sekundärstrukturvorschläge, die in der Literatur für die 5S und 5.8S RNA gemacht wurden, so fällt auf, daß die meisten Modelle nicht zu vernachlässigende Anteile von GU-Basenpaaren enthalten. Die Untersuchung ihrer Struktur sollte also mit Methoden durchgeführt werden, die die Effekte dieser Basenpaarung richtig wiedergeben.

Die Möglichkeit der Existenz einer solchen ungewöhnlichen Basenpaaranordnung (Abb. 1) wurde bereits 1966 von F.H.C. Crick diskutiert⁴¹. Die dritte Position des genetischen Codes ist degeneriert, und die einfachste Erklärung dafür ist, daß auch einige ungewöhnliche Basenpaare, die "wobble pairs", existieren. Modellrechnungen mit Hilfe der aus Röntgenstrukturuntersuchungen bekannten Moleküldimensionen ergaben, daß durch die Existenz eines GU-Basenpaares innerhalb einer Doppelhelix deren Geometrie kaum gestört wird⁴².

Abb. 1

Die Struktur des
GU-Basenpaares
nach Crick



Bisher wurden nur wenige experimentelle Hinweise gefunden. Das Kleeblattmodell einiger t-RNAs enthält Guanin und Uracil in gegenüberliegender Anordnung. In diesen Fällen findet man in

ihrem NMR-Spektrum ein Signal zwischen -10 und -11 ppm, wobei einem Basenpaar zwei Resonanzlinien entsprechen⁴³. Während es nicht gelang, einen doppelhelicalen Komplex von alternierendem Poly (G-U) darzustellen, bildet alternierendes Poly d(G-T) eine Doppelhelix⁴⁴, die auch das aus den NMR-Spektren der t-RNAs geforderte Signal bei -10,5 ppm ergibt⁴⁵.

1.4 Aufgabenstellung

Die GU-Wechselwirkung sollte an geeigneten Modellsystemen charakterisiert werden. Hierzu sollte das GU-Basenpaar in die Poly G·Poly C - und in die Poly A·Poly U - Doppelhelix eingebaut werden. Durch Vergleich dieser Komplexe mit denen der reinen Homopolymeren sollten die sich mit verschiedenen physikalisch-chemischen Methoden ergebenden Effekte der GU-Basenpaarung gemessen werden.

Die Methode der Strukturaufklärung natürlich vorkommender Nukleinsäuren mit Hilfe der IR-Spektroskopie sollte durch die Charakterisierung des Einflusses der GU-Basenpaarung auf das Spektrum verbessert werden.

Durch die Analyse der IR-Spektren von zwei prokaryontischen 5S RNAs sowie der 5S und der 5.8S RNA aus Hefe sollte ein Beitrag zur Strukturaufklärung dieser ribosomalen Nukleinsäuren geleistet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Substanzen

Die Substanzen wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Boehringer, Mannheim

5'-Guanosinmonophosphat	(GMP)
5'-Cytidindiphosphat	(CDP)
5'-Uridindiphosphat	(UDP)
Adenylyl-(3'-5')-adenosin	(ApA)
Cytidylyl-(3'-5')-cytosin	(CpC)
Uridylyl-(3'-5')-uridin	(UpU)
Adenylyl-(3'-5')-guanosin	(ApG)
(Adenylyl-(3'-5')-) ₂ adenosin	(ApApA)
Polyadenylsäure	(Poly A)
Polycytidylsäure	(Poly C)
Polyguanylsäure	(Poly G)
Polyuridylsäure	(Poly U)
alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, Reinheitsgrad I	
Polynukleotid-Phosphorylase aus <i>Micrococcus Luteus</i>	
Ribonuklease T ₁ aus <i>Aspergillus oryzae</i>	
Trypsin aus Rinderpankreas	
Trypsin-Inhibitor aus Hühnereiweiß	

Sigma, München

Polyadenyl-uridylsäure	(Poly A,G)
Ribonuklease A aus Rinderpankreas	
Ribonuklease T ₂ aus <i>Aspergillus oryzae</i>	

Pharmacia, Uppsala (Schweden)

DEAE-Sephadex A 25
Sephadex G 25
Sephadex G 100

Die übrigen Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.a. und wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

Die 5S und 5.8S RNAs wurden von B.Appel im Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin isoliert¹³.

2.2 Synthese der Modellverbindungen

2.2.1 Säulenchromatographische Trennungungsverfahren

Da die wichtigsten Trennungungsverfahren für alle hier beschriebenen Synthesen von Modellverbindungen wichtig sind, wurde ihre Beschreibung den weiteren Verfahren vorangestellt.

Zur Trennung der bei den Synthesen erhaltenen Substanzgemische wurden säulenchromatographische Verfahren gewählt. Sie bieten den Vorteil gegenüber anderen Verfahren wie Dünnschichtchromatographie, daß große Mengen Substanz (10 - 50 mg) in relativ kurzer Zeit isoliert werden können.

Ionenaustauschchromatographie

Das zu trennende Substanzgemisch wird durch ionische Wechselwirkung auf einer Säule (DEAE-Sephadex A 25, 2 x 35 cm) gebunden. Die Nukleotide werden durch steigende Salzkonzentration bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 100 ml/h entsprechend ihrer Ladung eluiert. Die Konzentration im Eluat wird durch kontinuierliche Messung der Absorption bei 254 nm mit einem Durchflußphotometer (Uvicord II der Firma LKB, Uppsala, Schweden) bestimmt.

Gelfiltration

Das Substanzgemisch wird nach dem Molekulargewicht der einzelnen Fraktionen getrennt. Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht werden mit Sephadex G 25 (Säulendimension 3 x 90 cm, Durchfluß-

geschwindigkeit 160 ml/h), solche mit höherem Molekulargewicht werden mit Sephadex G 100 (Säulendimension 3 x 35 cm, Durchflußgeschwindigkeit 80 ml/h) getrennt. Hierbei wird zusätzlich zur Absorption auch die Leitfähigkeit der Lösung mit einem Konduktometer (LF 410 der Firma WTW, Weilheim) registriert. Ein typisches Elutionsdiagramm zeigt Abb. 2. Das Polynukleotid ist vollständig von der niedermolekularen leitfähigen Fraktion getrennt.

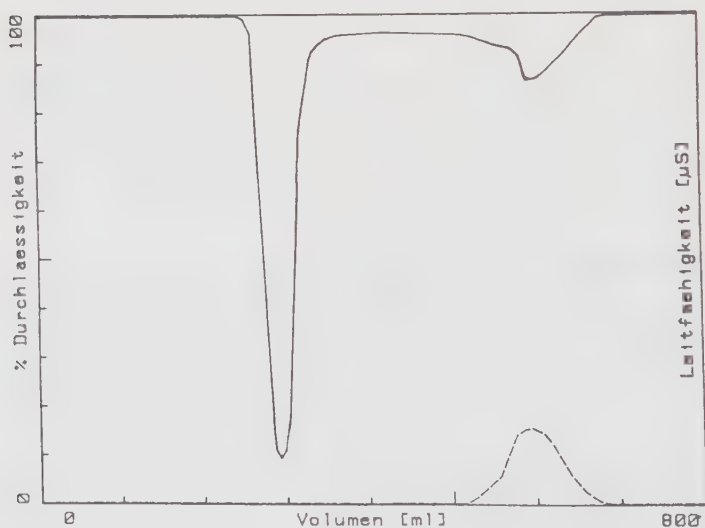


Abb. 2

Elutionsdiagramm einer Probe von Poly G·Poly (C,U), die mit niedermolekularen Verbindungen verunreinigt ist.

2.2.2 Adenylyl-(3'-5')-guanylyl-(3'-5')-adenosin (ApGpA)

Zur Synthese des ApGpA aus ApG wurde eine enzymatische Methode mit Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase) gewählt. Die Reaktion verläuft nach dem folgenden Schema:



Es ist hierbei nicht möglich, nur einen einzigen Adenylrest anzupolymerisieren; man bekommt ein Gemisch mit einer gewissen Kettenlängenverteilung, deren mittlere Größe durch zwei Verfahren beeinflußt werden kann:

a) Kinetische Methode⁴⁷

Bei gegebener NaCl-Konzentration wird das Kettenwachstum bei einer gewissen Länge praktisch gestoppt. Wird bei höherer NaCl-Konzentration gearbeitet, so werden kürzere Ketten bevorzugt.

b) Gleichgewichtsmethode⁴⁸

Da durch Enzyme auch die Rückreaktion katalysiert wird, werden bei steigender Inkubationszeit die entstandenen Polynukleotide wieder zu den dann thermodynamisch begünstigten Oligonukleotiden abgebaut. Die mittlere Kettenlänge wird durch das Verhältnis von Primer zu Nukleosiddiphosphat kontrolliert.

Eine Komplikation ergibt sich dadurch, daß PNPase normalerweise auch die Primer-unabhängige Reaktion katalysieren und so zur Homopolymerisation führen kann. Es besteht allerdings die Möglichkeit, diese Reaktion durch teilweise Hydrolyse des Enzyms mit Trypsin zu unterdrücken⁴⁹.

5 mg PNPase werden mit 0,05 mg Trypsin in einer 0,5 M NaCl-Lösung 2 Stunden bei 37°C behandelt. Anschließend werden

0,1 mg Trypsin-Inhibitor zugegeben. Das so behandelte Enzym ist nicht mehr in der Lage, ADP ohne Zugabe von Primer zu polymerisieren. Bei einer Dünnschicht-Chromatographie auf Cellulose-beschichteten Platten mit einem Elutionsmittel, das 50% Äthanol und 50% 1M Ammoniumacetat enthielt, konnte nur ein Fleck identifiziert werden, der dem ADP entsprach.

Mit dem so erhaltenen Enzym werden 20 μ mol ApG und 20 μ mol ADP in Glycin-Puffer (0,2 M Glycin, 0,15 M NaCl, pH 9,3) 60 h inkubiert. Die PNPase wird durch Erhitzen im siedenden Wasserbad denaturiert. Um die nachfolgende Auftrennung zu erleichtern, werden endständige Phosphatgruppen durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase abgebaut.

Die Trennung des Nukleotidgemisches wurde durch ein dreistufiges Säulenchromatographieverfahren erreicht.

DEAE-Sephadex $\cdot$ Cl⁻

Eine sehr gute Trennung von Oligonukleotidgemischen ergibt die Chromatographie an DEAE-Sephadex A 25 in 7 M Harnstofflösung⁵⁰. Abb. 3 zeigt das Elutionsdiagramm, das mit einem linearen Gradienten mit steigender NaCl-Konzentration erhalten wird. Die einzelnen Peaks wurden wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben identifiziert.

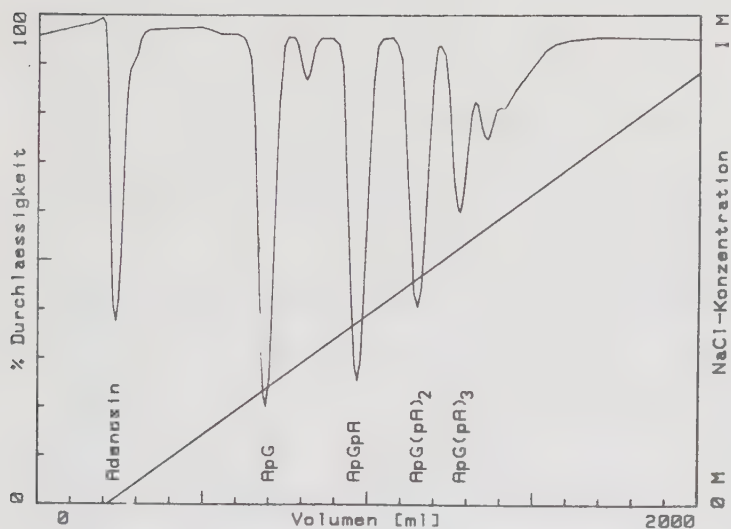


Abb. 3

Elutionsdiagramm eines ApG(pA)_n -Gemisches
(DEAE-Sephadex A 25, 2 x 35 cm, 7 M Harnstoff, Gradient: 0-1 M NaCl)

DEAE-Sephadex $\cdot \text{HCO}_3^-$

Bei unmittelbar folgender Gelfiltration wird die Ausbeute wegen des hohen NaCl-Gehaltes stark verringert. Deswegen wird eine weitere Ionenaustauschchromatographie mit dem gleichen Gel und einem linearen Gradienten mit steigender Triäthylammoniumhydrogencarbonat-Konzentration durchgeführt.

Das Elutionsmittel wird aus frisch destilliertem Triäthylamin hergestellt. Bei 0°C wird CO_2 durch eine 1 M Triäthylamin-Lösung geleitet bis ein pH von 7,5 erreicht ist.

Die Chromatographie wird bei 4°C in einer gekühlten Säule durchgeführt. Abb. 4 zeigt den verglichen mit dem ersten Chromatographie-Schritt breiten Peak, der auf eine geringere Trennschärfe dieses Schrittes hindeutet. Die ApGpA-baltigen Fraktionen werden gesammelt und im Rotationsverdampfer bei 40°C bis zur Trockenheit eingeengt. Hierbei wird sowohl das Wasser als auch das Triäthylammonium-hydrogencarbonat abgetrennt.

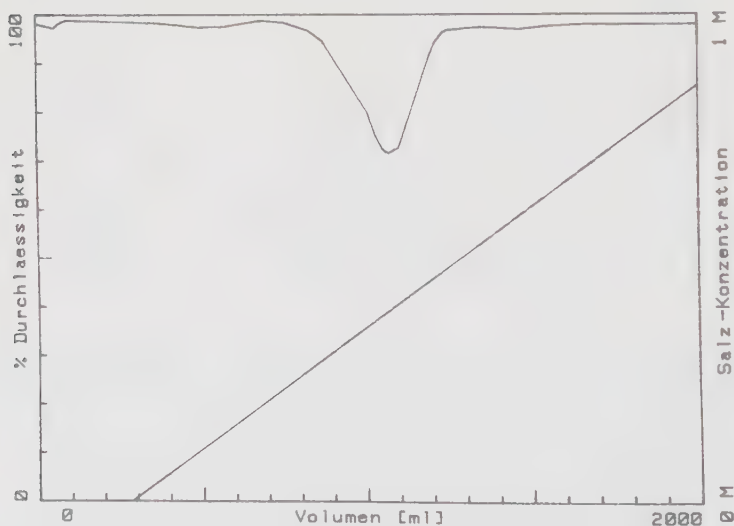


Abb. 4

Elutionsdiagramm des ApGpA
(DEAE-Sephadex A 25, 2 x 35 cm, Gradient: 0-1 M $\text{Et}_3\text{NH} \cdot \text{HCO}_3$)

Sephadex G 25

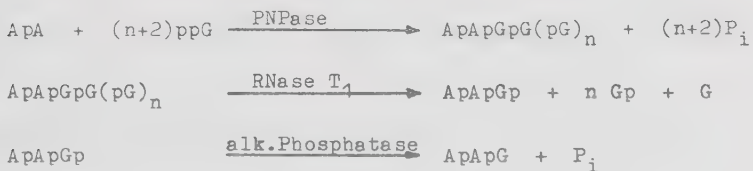
Durch eine abschließende Gelfiltration an Sephadex G 25 wird ein von allen Verunreinigungen freies Produkt erhalten,

das bei einer Dünnschichtchromatographie auf Celluloseplatten nur einen einzigen Fleck ergibt.

Die Ausbeute bei dem geschilderten Verfahren beträgt etwa 15% bezogen auf die eingesetzte Menge ApG.

2.2.3 Oligonukleotide mit einem endständigem Guanosin

Zur Synthese von (Adenylyl-(3'-5')-)₂guanosin (ApApG) und von (Adenylyl-(3'-5')-)₃guanosin wurde eine leicht modifizierte Version der Methode von R.E. Thach verwendet⁴⁶. 8 μ mol ApA bzw. ApApA, 40 μ mol GDP, 2mg (60 U) Polynukleotid-Phosphorylase und 500 U Ribonuklease T₁ werden in 1 ml Puffer (10 mM MgCl₂, 0,2 M Tris, pH 8,3) gelöst und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die PNPase wird durch Erhitzen denaturiert. Anschließend werden 10 U alkalische Phosphatase und 200 U Ribonuklease T₁ zugegeben und weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion verläuft nach dem folgenden Schema:



Zunächst wird ein Block von Guanylcysten an den Primer anpolymerisiert. Ribonuklease T₁ hydrolysiert spezifisch die 5'-Bindung von Phosphatgruppen, die mit Guanosin in 3'-Position verknüpft sind. Da hierbei Oligonukleotide mit einer 3'-Phosphatgruppe als Ende entstehen, kann kein weiteres GDP mehr anpolymerisiert werden.

Da bei dieser Synthese kein so kompliziertes Gemisch entsteht

wie bei der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen, kann die erste Aufreinigungsstufe entfallen. Es genügt eine Chromatographie an DEAE-Sephadex $\cdot \text{HCO}_3^-$ gefolgt von einer Gelfiltration an Sephadex G 25.

Die Ausbeute beträgt bei diesem Verfahren wegen des höheren Reaktionsumsatzes mit nur einem Reaktionsprodukt 77%.

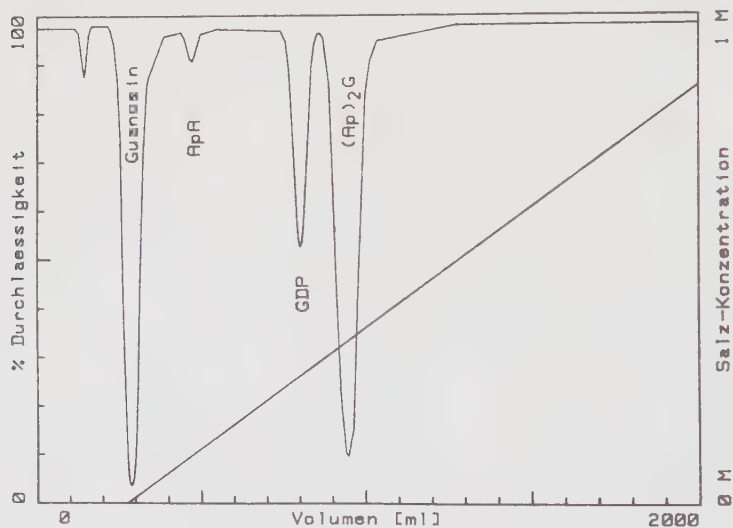


Abb. 5

Elutionsdiagramm eines Reaktionsgemisches
(DEAE-Sephadex A 25, 2 x 35 cm, Gradient: 0-1 M $\text{Et}_3\text{NH} \cdot \text{HCO}_3$)

2.2.4 Polycytidyl-uridylsäure (Poly (C,U))

Da das Poly (C,U) dazu bestimmt war, mit Poly G zu einem doppelhelicalen Komplex umgesetzt zu werden, wurde in einem Vorversuch ein hierfür geeignetes Baseneinbauverhältnis getestet. Poly G bildet unter üblichen Bedingungen eine Vierfach-Helix, die sehr stabil ist und deswegen die Bildung einer Doppelhelix mit Poly C verhindert^{51,52}. In konzentrierter Harnstofflösung wird die Sekundärstruktur des Poly G so destabilisiert, daß sich bei 85°C eine Doppelhelix mit Poly C bildet⁵³. Analoge Verhältnisse sind für die Reaktion mit Poly (C,U) zu erwarten, wobei in diesem Falle das Reaktionsprodukt weniger stabil ist als im Falle der Reaktion mit Poly C.

5 μ mol eines Gemisches von GDP und UDP, 0,01 μ mol CpU und 0,2 mg PNPase wurden in Glycin-Puffer (0,2 M Glycin, 10 mM $MgCl_2$, pH 9,3) 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Polynukleotid wurde bei pH 5 mit Äthanol gefällt, gegen bidestilliertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 40% der maximal möglichen. Das Baseneinbauverhältnis des statistischen Kopolymeren wurde wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben analysiert.

Zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit an Poly G wurden äquimolare Mischungen von Poly G und Poly (C,U) in einer 7 M Harnstofflösung mit einer Aufheizrate von 1°C/min erwärmt. Die Extinktion bei 285 nm wurde in Abhängigkeit von der Temperatur registriert (Abb. 6).

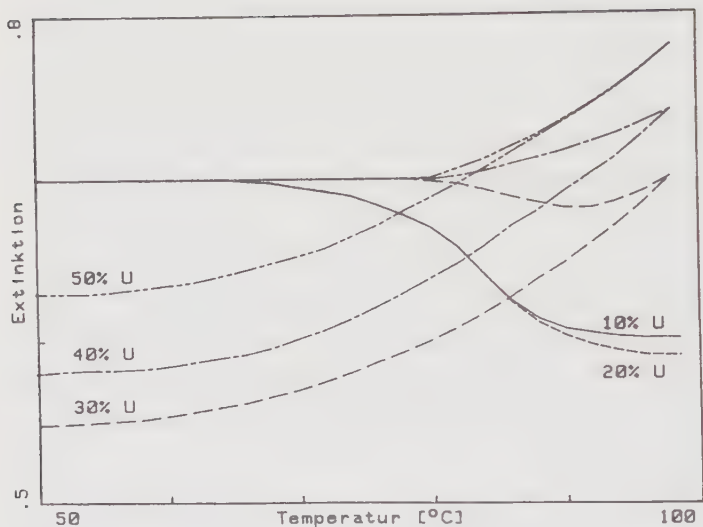


Abb. 6

Die bei 285 nm gemessene Extinktion von Gemischen verschiedener Poly (C,U)-Proben (der jeweilige Uracil-Gehalt ist angegeben) mit Poly G als Funktion der Temperatur.

Während bei 10% und 20% Uracil-Gehalt die erreichte Endextinktion leicht abnimmt, beobachtet man bei 30% Uracil-Gehalt eine leichte Abnahme der Extinktion, die bei weiterer Temperaturerhöhung wieder ansteigt. Vermutlich bildet sich vorübergehend teilweise der doppelhelicale Komplex, der bei weiterer Temperaturerhöhung wieder teilweise in die Einzelstränge zerfällt. Deswegen wurde auch beim Abkühlen ($1^{\circ}/\text{min}$) die Extinktion registriert. Man erhält eine Kurve, bei der die bei 50°C gemessene Endextinktion beträchtlich kleiner ist, als die des

Ausgangsgemisches. Bei weiter erhöhtem Uracil-Gehalt wird die Endextinktion wieder höher. Dieses Verhalten läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß im Gleichgewicht neben der gebildeten Doppelhelix auch nicht umgesetzte Ausgangsmaterialien vorliegen. Für die weiteren Messungen wurde deshalb ein Poly (C,U) mit einem Uracil-Gehalt von 30% verwendet.

2.2.5 Die Polynukleotidkomplexe

Poly A · Poly U

Poly A und Poly U werden in Wasser gelöst und durch Dialyse von niedermolekularen Verunreinigungen befreit. Die Lösungen werden nach der Bestimmung der Konzentration (siehe Kapitel 2.3) äquimolargemischt und gefriergetrocknet. Zur Bereitung von Lösungen läßt man die eingewogene Menge des gefriergetrockneten Produktes mit dem gewünschten Puffer bei 4°C mindestens 2 Tage stehen. Dabei bildet sich der doppelhelicale Komplex⁵⁴.

Poly (A,G) · Poly U und die tripelhelicalen Komplexe von Poly U mit (Ap)₂G und (Ap)₃G

Die Komplexe werden analog der unter Poly A · Poly U gegebenen Vorschrift hergestellt. Die Dialyse entfällt im Falle der Oligonukleotide und wird durch Gelfiltration an Sephadex G 25 ersetzt. Die Stöchiometrie der entstandenen Komplexe wird wie unter Kapitel 2.2.6 beschrieben festgelegt.

Poly G · Poly C und Poly G · Poly (C,U)

Lösungen äquimolarer Mischungen der Polynukleotide werden mit Harnstoff gesättigt. Die Lösung wird 10 min im siedenden

wasserbad erwärmt. Das doppelhelicale Polynukleotid wird durch Gelfiltration an Sephadex G 25 gereinigt und gefriergetrocknet (siehe Abb. 2).

2.2.6 Basenanalyse

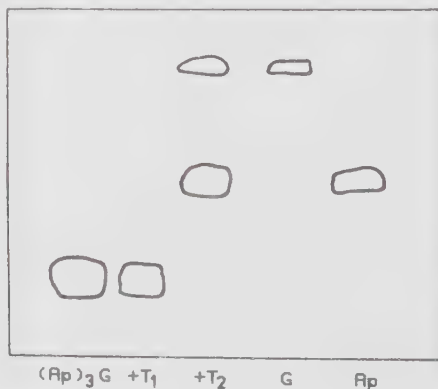
Oligonukleotide

ApGpA, $(Ap)_2G$ und $(Ap)_3G$ werden mit RNase T_1 und RNase T_2 behandelt. Die Produkte werden durch Dünnschichtchromatographie auf Celluloseplatten aufgetrennt (Fließmittel: 50% Äthanol, 50% 1 M Ammoniumacetat). Man identifiziert die Substanzen in den Flecken als die erwarteten Reaktionsprodukte durch mitgelaufene Vergleichssubstanzen. Die Flecke werden ausgekratzt und die Probenmenge mit Hilfe der UV-Extinktion quantitativ bestimmt.

Als Beispiel sei die Analyse des $(Ap)_3G$ gezeigt (Abb. 7). RNase T_1 kann dieses Oligonukleotid nicht spalten, während RNase T_2 das 3'-Ende von Purinen spaltet. Als Reaktionsprodukt erhält man 3'-AMP und Guanosin. Die quantitative Bestimmung ergab 76,1% AMP und 23,9% Guanosin.

Abb. 7

Basenanalyse
des $(Ap)_3G$



Polynukleotide

Poly (A,G) wird durch ein Gemisch von RNase T₁ und RNase T₂,
Poly (C,U) wird durch RNase A hydrolysiert.

Die entstehenden 3'-Mononukleotide werden durch eine Dünnschichtchromatographie mit Celluloseplatten aufgetrennt (Fließmittel: 200 ml Isopropanol, 20 ml HCl conc., 30 ml H₂O)⁵⁵. Man kratzt die entstandenen Flecke aus und bestimmt die Nukleotide durch ihre UV-Extinktion quantitativ.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Poly (C,U) enthielt 70% C und 30% U, Poly (A,G) enthielt 60% A und 40% G. Die Bestimmungsmethode ist mit einem Fehler von 1% behaftet.

2.2.7 Gelelektrophorese

Die Kettenlänge der synthetisierten Polynukleotide und der für die NMR-Spektroskopie bestimmten Proben wurde durch Gelelektrophorese bestimmt. Hierbei wird die Wanderung des Nukleotides im elektrischen Feld mit der von Vergleichssubstanzen mit bekanntem Polymerisationsgrad verglichen.

Eine Lösung von 10 g Acrylamid, 180 mg Bisacrylamid und 42 g Harnstoff in 100 ml Puffer (10 mM Tris, 10 mM Borsäure, 0,2 mM EDTA, pH 7,5) wird sorgfältig entgast. Nach Zugabe von 50 μ l N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylendiamin und 2 ml einer Lösung von 1,6 g Ammoniumperoxodisulfat in 100 ml Wasser startet die Polymerisation.

Die Elektrophorese wurde auf Glasplatten (20 x 30 cm) bei einer Dicke der Gelschicht von 3 mm mit Nukleotidmengen von

0,1 mg bis 0,2 mg bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Dabei wurde ein Elektrophoresegerät, Modell Pherograph-Original-Frankfurt, Typ Mini 68 der Firma Hormuth-Vetter, Wiesloch verwendet. Die Stromstärke wurde auf 5 mA geregelt.

Die Lage der Nukleotide wurde durch ihre Absorption bei 260 nm mit einem Spektralphotometer der Firma Zeiss, Oberkochen, Modell PMQ II in Verbindung mit dem Monochromator M4Q III und dem Gelscanner ZK4 bestimmt. Die Küvetten wurden in der Institutswerkstatt gefertigt.

2.2.8 Die Bestimmung der Stöchiometrie der Komplexe

Eine Mischung von zwei absorbierenden Substanzen A und B, die nicht miteinander in Wechselwirkung treten, zeigt eine Extinktion, die gegeben ist durch das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$E = (C_A \epsilon_A + C_B \epsilon_B) d$$

Hält man die Gesamtkonzentration konstant und trägt die gemessene Extinktion gegen das Mischungsverhältnis auf (Mischkurve), so erhält man eine Gerade.

Bildet sich ein Komplex der beiden Substanzen, so wird dieser im allgemeinen von der reinen Mischung verschiedene spektroskopische Eigenschaften haben. Dies macht sich in einer Knickstelle in der Mischkurve bemerkbar. Die Mischkurve ist in diesem Falle bei einer hohen Bildungskonstanten des Komplexes aus zwei Geraden zusammengesetzt, deren Schnittpunkt die Stöchiometrie des Komplexes angibt (Job plot)^{56,57}.

Zur Ermittlung der UV-Mischkurven wurden Lösungen mit einer

Konzentration von 10^{-4} Mol/l hergestellt. Die Komponenten werden gemischt und die Extinktion bei einer geeigneten Wellenlänge gemessen. Bei der angegebenen Prozedur können Probleme auftauchen, wenn die Extinktion des Komplexes zufällig den gleichen Wert hat wie die entsprechende Mischung ohne Komplexbildung, bzw. wenn mehrere Komplexe auftreten und die Extinktion des einen zufällig auf der Verbindungslinie der Extinktionen anderer in dem System vorkommender definierter Substanzen liegt. Ein Beispiel hierfür ist das System Poly A/ Poly U, von dem bekannt ist, daß sich in 0,1 M NaCl-Lösung je nach dem Mischungsverhältnis eine Doppel- oder eine Tripelhelix bildet⁵⁸.

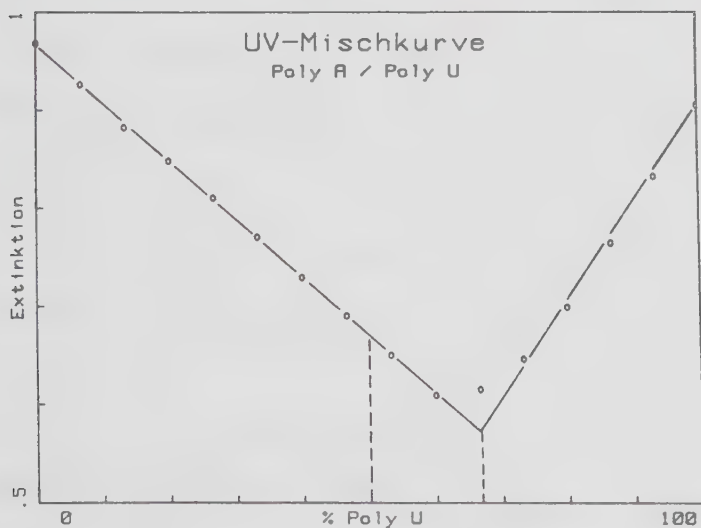


Abb. 8

UV-Mischkurve des Systems Poly A/ Poly U
(0.1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5, 260 nm)

Abb. 8 zeigt die Mischkurve von Poly A und Poly U, die bei 260 nm gemessen wurde. Die Bildung der Doppelhelix ist in diesem Diagramm nicht nachweisbar. Wird die Extinktion bei anderen Wellenlängen gemessen, so erkennt man deutlich die Bildung beider Helices⁵⁹. Aus dem Nichtvorliegen einer Knickstelle kann also nicht gefolgert werden, daß keine Komplexbildung auftritt.

Die UV-Mischkurven ergeben keine Information über einzelne Molekülteile, da die Absorptionsbanden im UV sich stark überlagern. Deswegen wurden auch IR-Mischkurven aufgenommen. Hierbei muß das oben geschilderte Verfahren modifiziert werden.

Die Komponenten werden in D₂O gelöst und die Konzentrationen der Lösungen bestimmt. Die Lösungen werden eingewogen und daraus das Mischungsverhältnis und die Konzentration der jeweiligen Mischung errechnet. Die IR-Spektren jeder Mischung werden im Bereich von 1800 cm⁻¹ bis 1400 cm⁻¹ registriert (siehe Kapitel 2.5). Abb. 9 zeigt als Beispiel auf Extinktionskoeffizienten normierte Spektren des Systems (Ap)₃G/Poly U, von dem aus der Literatur bekannt ist, daß sich ein tripelhelicaler Komplex mit zwei Poly U-Ketten und einer Kette aus Adenylresten bildet. Der Guanyrest ist aus der Kette herausgefaltet⁶⁰.

Mit Hilfe der Spektren kann entschieden werden, an welchen Stellen die deutlichsten Änderungen auftreten oder wo Information über eine einzelne Base erhalten werden kann. Die entsprechenden Extinktionskoeffizienten werden gegen das Mischungsverhältnis aufgetragen. In dem gewählten Beispiel (Abb. 10) erkennt man deutlich die erwarteten Knickstellen bei 60% Poly U.

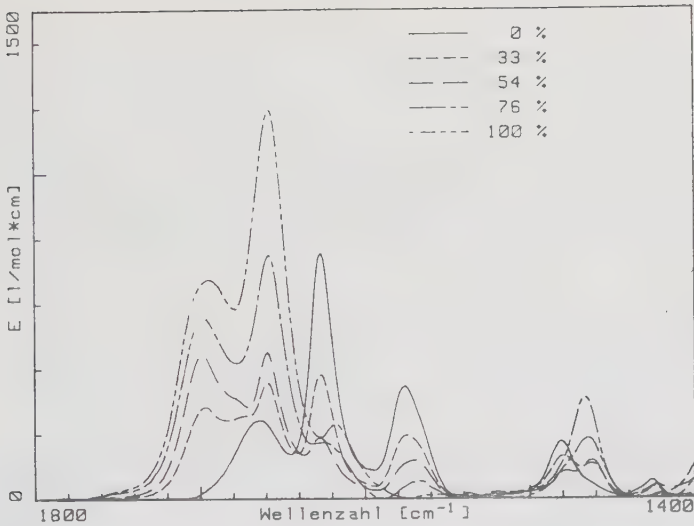


Abb. 9

IR-Spektren verschiedener Mischungen von $(Ap)_3G$ und Poly U
(1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5, 150°C)

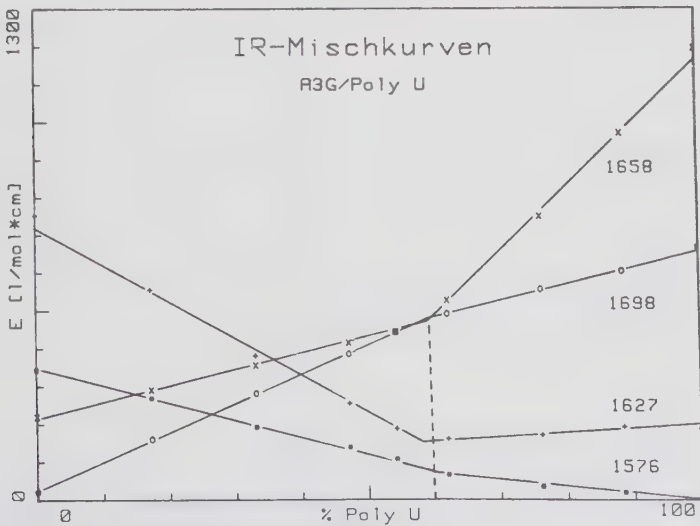


Abb. 10

IR-Mischkurven des Systems $(Ap)_3G$ / Poly U

2.3 Konzentrationsbestimmung

2.3.1 Phosphatanalyse

Alle Konzentrationsbestimmungen wurden durch eine Phosphatanalyse oder über die UV-Extinktion der Lösung durchgeführt. Die Extinktionskoeffizienten wurden über die Phosphatanalyse bestimmt.

Lösungen

- | | |
|---------------------------|---|
| 1. Standardphosphatlösung | 1 mM KH_2PO_4 |
| 2. Natriumsulfitlösung | 15 g Na_2SO_3 in 100 ml H_2O |
| 3. Molybdatlösung | 12,5 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 500 ml H_2O |
| 4. Hydrazinsulfatlösung | 150 mg $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml H_2O |
| 5. Perchlorsäure (70%) | |

Die Proben werden in gebogene Reagenzgläser eingewogen und mit 0,3 ml Perchlorsäure 20 Minuten abgeraucht. Die Probe wird mit 0,8 ml Natriumsulfitlösung versetzt und kurz erwärmt. Nach Zugabe von 1 ml Molybdatlösung, 0,4 ml Hydrazinsulfatlösung und 10 ml Wasser wird die Probe 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Extinktion der entstehenden blauen Lösung wird bei 660 nm mit einem Spektralphotometer (Pye Unicam, Modell SP 1800) in Küvetten mit einer Schichtdicke von 3 cm gemessen. Mit Hilfe einer analog erhaltenen Eichbeziehung wird die Phosphatmenge errechnet. Die Genauigkeit der ermittelten Konzentration beträgt 1%.

2.3.2 Optische Konzentrationsbestimmung

Schneller und einfacher als durch die Phosphatanalyse erhält man die Konzentration aus der Extinktion der Nukleotidlösung. Da die

Werte der Extinktionskoeffizienten, die der Literatur entnommen wurden, zu Konzentrationen führten, die bis zu 10% von den aus der Phosphatanalyse ermittelten abwichen, wurden alle Extinktionskoeffizienten, die im Verlaufe dieser Arbeit benutzt wurden, durch Konzentrationsbestimmung mit einer Phosphatanalyse überprüft und neu bestimmt (Tabelle II).

Alle Extinktionskoeffizienten sind auf 1 mol Nukleotid bezogen. Sie wurden bei der Wellenlänge bestimmt, bei der die Extinktion ein Maximum erreicht. Die Genauigkeit beträgt 1%.

Tabelle II: UV-Extinktionskoeffizienten von Nukleotiden bei pH 7,5

Substanz	λ [nm]	ϵ [l/mol·cm]
AMP	259	14 900
CMP	271	9 000
GMP	252	14 000
UMP	262	9 750
ApA	258	12 200
(Ap) ₂ ^A	257	11 390
(Ap) ₂ ^G	256	11 620
(Ap) ₃ ^G	256	10 930
ApGpA	257	10 120
Poly A	257	10 180
Poly C	268	6 200
Poly G	253	9 550
Poly U	260	9 050
Poly (A,G)	256	10 150
Poly (C,U)	266	6 920
Poly A · Poly U	257	6 750
Poly (A,G) · Poly U	257	7 620
Poly G · Poly C	257	7 460
Poly G · Poly (C,U)	260	8 130

2.4 UV-Spektroskopie

Die Messungen der UV-Absorption wurden mit Hilfe der Spektralphotometer Modell 124 der Firma Perkin-Elmer und Modell SP 1800 der Firma Pye Unicam durchgeführt. Beide Spektrometer erlauben das Arbeiten mit thermostatisierten Küvetten. Thermische Umwandlungskurven wurden mit Aufheizgeschwindigkeiten von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ registriert. Die Temperatur wurde mit einem von M. Grubert gebauten digitalen Thermometer in der Lösung gemessen. Da nur die untere Hälfte der mit 3 ml Lösung gefüllten 1 cm-Küvetten vom Lichtstrahl erfaßt werden, kann im oberen Drittel bei guter Befestigung der als Meßelement dienenden Halbleiterdiode die Temperatur ohne Störung der Messung bestimmt werden. Die Spektren wurden mit einem Tischrechner, Modell 9845 A der Firma Hewlett-Packard in Verbindung mit einem XY-Schreiber digitalisiert und auf molare Konzentration umgerechnet.

2.5 IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden mit einem Doppelstrahl-Gitterspektrometer der Firma Perkin-Elmer, Modell 325, aufgenommen. Das Gerät ist mit einer Trockenluftspüleinrichtung ausgerüstet, um Meßfehler infolge zu großer CO_2 - und H_2O -Absorption und daraus folgender Inkompensation von Meß- und Vergleichsstrahl zu vermeiden.

Die thermostatisierbaren Küvetten wurden in der Institutswerkstatt angefertigt. Als Fenstermaterial wurde CaF_2 verwendet. Die Schichtdicke betrug $50\text{ }\mu\text{m}$; ihr genauer Wert wurde aus den Interferenzen der leeren Küvetten im Bereich von 5000 cm^{-1} bis

2000 cm^{-1} errechnet. Als Lösungsmittel wurde D_2O verwendet. Die Temperatur wurde mit einem von M. Grubert gebauten Digitalthermometer direkt an den CaF_2 -Fenstern gemessen.

Die Spektren wurden im Bereich der Doppelbindungsschwingungen von 1900 cm^{-1} bis 1400 cm^{-1} bei einer Auflösung von 2 cm^{-1} gemessen. Sie wurden mit Hilfe eines von G. Messner gebauten elektronischen Speichers als Durchlässigkeitsspektren aufgenommen, dessen Datenaufnahme direkt über den Wellenlängenvorschub des IR-Spektrometers getriggert wird⁶¹. Die Daten wurden mit einem Tischrechner der Firma Hewlett-Packard, 9845 A weiterverarbeitet.

Durch mehrfaches Registrieren des gleichen Spektrums, Mittelung der erhaltenen Spektren und Errechnen der Durchlässigkeit ($I/I_0 \cdot 100\%$) mit Hilfe analog erhaltener Grundlinien konnte eine erhebliche Vereinfachung des Auswerteverfahrens und eine höhere Genauigkeit als bei früheren Verfahren⁶² erreicht werden. Die Probenvorbereitung konnte vereinfacht werden, da durch leichten HOD-Gehalt verfälschte Spektren rechnerisch korrigiert werden konnten.

Alle registrierten Spektren werden in der Form von Extinktionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Wellenzahl angegeben. Sie sind auf 1 mol Nukleotid bezogen. Die Digitalisierungsschrittbreite beträgt $1\text{ cm}^{-1}/\text{Datenpunkt}$.

Die GU-Spektren wurden durch Abziehen der stöchiometrischen Anteile von Poly A · Poly U und Poly G · Poly C aus den experimentellen Spektren von Poly (A,G) · Poly U und Poly G · Poly (C,U) erhalten, wobei die erhaltenen Spektren wieder auf 1 mol

Nukleotid bezogen wurden.

Die Spektren der ribosomalen RNAs wurden ausgewertet durch Vergleich der experimentellen Spektren mit simulierten. Dabei wurde die aus der Primärstruktur bekannte Basenzusammensetzung zugrunde gelegt. Es wurde angenommen, daß die IR-Absorption nicht von den Nachbarbasen innerhalb einer Kette abhängt, sondern nur davon, ob eine Base frei vorkommt oder in Form eines Basenpaares gebunden ist. Der Extinktionskoeffizient ist dann nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz an jeder Stelle des Spektrums gegeben als

$$\epsilon = X_A \epsilon_A + X_U \epsilon_U + X_G \epsilon_G + X_C \epsilon_C + X_{AU} \epsilon_{AU} + X_{GC} \epsilon_{GC} + X_{GU} \epsilon_{GU}$$

wobei X_A , X_U , X_G und X_C die Molenbrüche der freien Nukleotide, X_{AU} , X_{GC} und X_{GU} die Molenbrüche der in Basenpaare involvierten Nukleotide und ϵ die entsprechenden Extinktionskoeffizienten sind.

2.6 NMR-Spektroskopie

Die Linien der NMR-Signale von polymeren Substanzen werden normalerweise mit steigendem Polymerisationsgrad immer breiter. Deswegen wurden die bisher in der Literatur publizierten NMR-spektroskopischen Untersuchungen mit Nukleinsäuren durchgeführt, die höchstens 120 Nukleotide in einer Kette enthielten^{103,104}.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten doppelhelicalen Komplexe wurden deshalb aus Nukleotiden mit einem Polymerisationsgrad von 50 - 100 hergestellt. Dazu wurden Polynukleotide

mit einem Polymerisationsgrad über 300 in 0,1 M KOH-Lösung 15 min hydrolysiert. Das entstehende Gemisch von Polynukleotiden verschiedener kleinerer Kettenlängen wurde durch eine Gel-filtration an Sephadex G 100 (siehe Kapitel 2.2.1) aufgetrennt. Die Kettenlänge der Proben wurde durch Gelelektrophorese überprüft (siehe Kapitel 2.2.7). Die Fraktionen mit einem Polymerisationsgrad von 50 - 100 wurden zur Darstellung der Komplexe verwendet.

Die Komplexe wurden wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben hergestellt. Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden 5-20 mg der Nukleotide in 300 μ l Puffer gelöst (0,1 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5). Die Lösung wurde gefriergetrocknet und anschließend zur Messung wieder in 300 μ l Wasser gelöst.

Die Messungen wurden von R. Römer in der Medizinischen Hochschule Hannover mit Hilfe eines NMR-Spektrometers der Firma Bruker bei 270 MHz durchgeführt. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurde das Verfahren der Korrelationsspektroskopie mit mehrfacher Aufnahme der Spektren und Mittelung derselben angewendet.

Die chemischen Verschiebungen wurden gegen DSS (2,2 - Dimethyl-2 - silapentan - 5 - sulfonat) als Standard gemessen.

2.7 Kalorimetrie

2.7.1 Beschreibung der Meßanordnung

Die kalorimetrischen Messungen wurden mit Hilfe eines adiabatischen Mikrokalorimeters der Sowjetischen Akademie der Wissenschaften, Modell DASM-1M⁶³ durchgeführt. Es enthält ein Proben- und ein Referenzgefäß mit gleichem Volumen. Beide Gefäße werden über Heizwicklungen von außen mit konstanter Heizgeschwindigkeit aufgeheizt. Die thermisch induzierte Umwandlung eines Biopolymers in dem Probengefäß führt zu einer meßbaren Änderung des Cp-Wertes. Diese wird ausgeglichen durch Erhöhung der Heizleistung in dem Gefäß mit höherer Wärmekapazität und Erniedrigung der Heizleistung im anderen Gefäß um den gleichen Betrag. Dadurch wird erreicht, daß der Unterschied der Heizleistungen von Proben- und Referenzgefäß proportional zur Regelungsspannung wird. Diese Spannung wird in Abhängigkeit von der Temperatur registriert; sie wird über eine elektrisch erzeugte Zusatzheizleistung kalibriert.

2.7.2 Probengefäße

Die Probengefäße bestehen aus zwei paarig angeordneten Goldzellen mit einem nominellen Füllvolumen von 1 ml. Um bei jeder Messung unter möglichst ähnlichen Bedingungen arbeiten zu können, müssen sie vollständig gefüllt werden.

Das genaue Füllvolumen, das bisher nicht bekannt war, wurde durch Messung der Aufheizgeschwindigkeit der Meßanordnung bei unterschiedlicher Füllmenge bestimmt. Eine definierte Menge einer Lösung von Poly A · Poly U mit bekannter Konzentration

wurde in das Probengefäß eingewogen. Die gleiche Menge Lösungsmittel wurde in das Referenzgefäß gefüllt. Die Aufheizdauer für eine Temperaturerhöhung von 10°C und die Umwandlun-
gentalpie der Poly A · Poly U-Doppelhelix in die Einzelstränge wurde gemessen. Abb. 11 zeigt die Aufheizdauer in Abhängigkeit von der Füllmenge. Die erhaltene Gerade erreicht bei einer Füllmenge von $960\ \mu\text{l}$ den Endwert von $1,017\ \text{min}/^{\circ}\text{C}$, der bei vollständig gefüllten Gefäßen erreicht wird. Zu dem so bestimmten Wert ist noch die Menge von $20\ \mu\text{l}$ hinzuzurechnen, die bei der Entleerung der Gefäße zurückbleibt. Sie wurde durch Messung der optischen Absorption bestimmt, die entsteht, wenn man eine Lösung mit bekannter Extinktion einfüllt und nach Entleeren mit einer bekannten Menge Wasser nachspült.

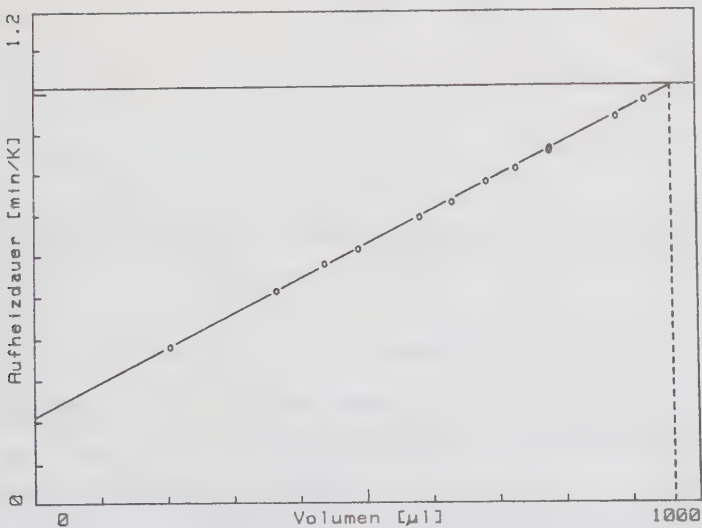


Abb. 11

Aufheizdauer bei nur teilweise gefüllten Zellen

Das gleiche Ergebnis, eine Gesamtfüllmenge von $980 \mu\text{l}$, erhält man, wenn man die gemessene Umwandlungsenthalpie gegen die Füllmenge aufträgt (Abb. 12). Hier ist jedoch die Lage der Geraden wegen der größeren Unsicherheit in der Bestimmung der Umwandlungsenthalpie weniger genau festgelegt.

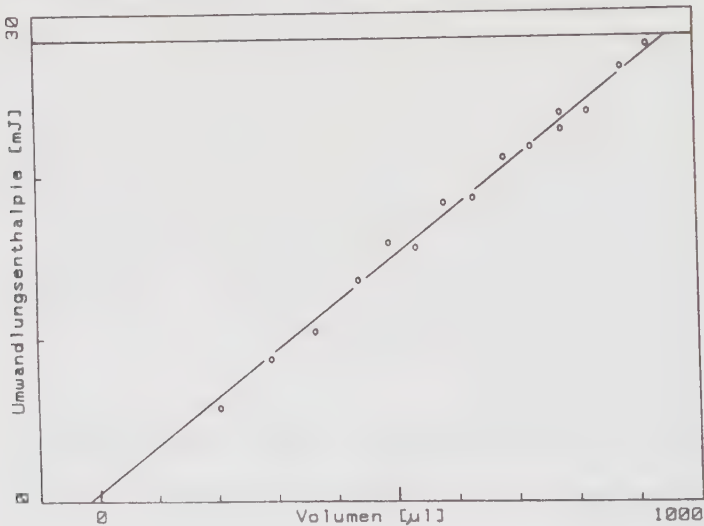


Abb. 12

Gemessene Umwandlungsenthalpie einer Polynukleotid-Lösung in Abhängigkeit von der Füllmenge

2.7.3 Auswertung der Messungen

Abb. 13 zeigt die thermische Umwandlungskurve einer Lösung des tripelhelicalen Komplexes von ApA und Poly U. Die Grundlinie ist gegenüber der gemessenen, die man erhält, wenn beide Gefäße mit Puffer gefüllt sind, um einen Betrag verschoben, der sich aus dem Unterschied der Wärmekapazitäten der Lösung und

des Lösungsmittels ergibt. Dieser Unterschied ändert sich in dem gezeigten Beispiel um einen Betrag ΔC_p während der Messung. Da die Menge der Lösung im Probenraum sich während der Messung nicht nur wegen der Temperaturerhöhung ändern kann, sondern auch wegen einer Änderung des partiellen Molvolumens des Nukleotides und der damit verbundenen Verdrängung von Lösungsmittel, ist die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p während der thermischen Umwandlung bei der beschriebenen Meßanordnung keine Stoffkonstante des gelösten Nukleotides. ΔC_p kann konzentrationsabhängig sein.

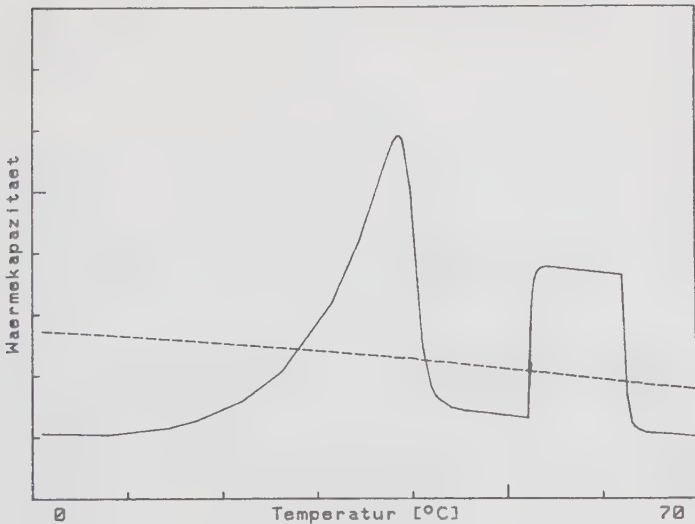


Abb. 13

Kalorimetrische Meßkurve einer thermischen Umwandlung des triphelicalen Komplexes von ApA und Poly U (1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5)

Die experimentelle Grundlinie wird soweit verschoben, daß ihr Anfangsbereich mit dem Anfang der Meßkurve zur Deckung kommt. Die Kurven werden digitalisiert (siehe Kapitel 2.4), und die Grundlinie wird von der Meßkurve abgezogen (Abb. 14, Kurve 1).

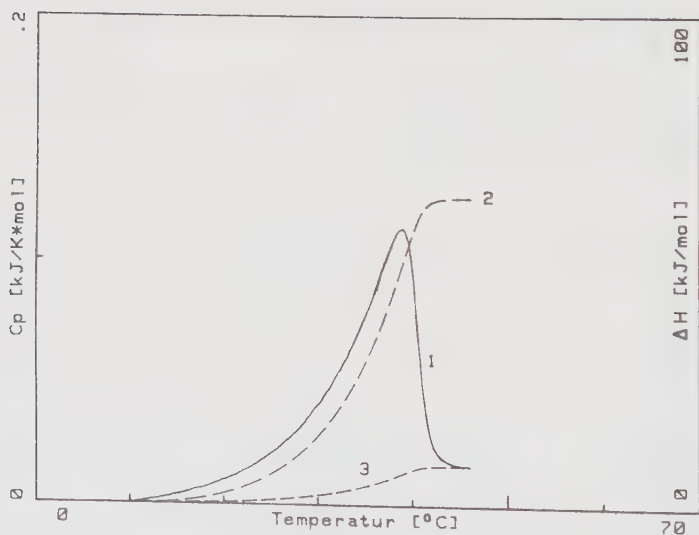


Abb. 14

Darstellung der Auswertung von kalorimetrischen Messungen

Man erkennt, daß sich die Grundlinie während der Messung geändert hat. Da sowohl das partielle Molvolumen der gelösten Nukleotide als auch die Molwärme intensive Größen sind und somit ihre Änderung proportional zum Umwandlungsgrad $\Theta(T)$ sein muß, kann eine Grundlinie $C_{p,0}(T)$ für die Meßkurve

errechnet werden (Kurve 3)

$$C_{p,o}(T) = \theta(T) \cdot \Delta C_p$$

Die Enthalpieänderung (Kurve 2) ergibt sich dann als

$$\Delta H(T) = N \cdot \int_{T_1}^{T_2} (C_p(T) - C_{p,o}(T)) dT$$

N ist ein Normierungsfaktor der aus der Kalibrierungsfläche errechnet werden kann, T_1 und T_2 sind die Anfangs- und die Endtemperatur der thermischen Umwandlung.

3. Ergebnisse

3.1 Die IR-Spektren von Modellsubstanzen für die nicht basengepaarten und für die in Form von Watson-Crick-Basenpaaren gebundenen Nukleotide

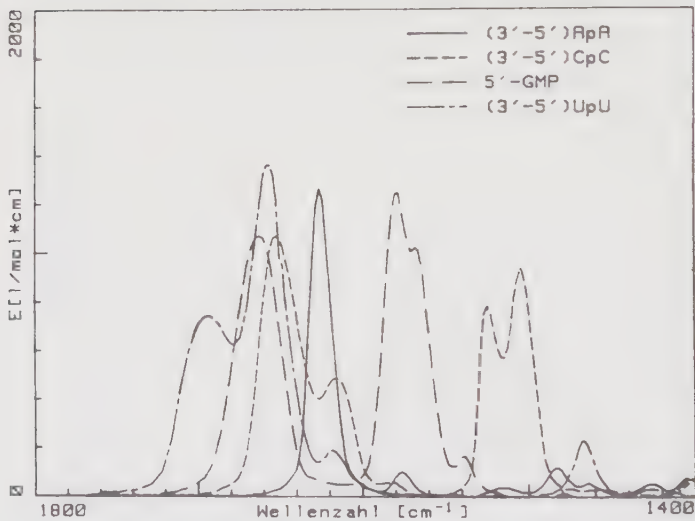


Abb. 15

Die IR-Spektren der (3'-5')-Dinukleotide ApA, CpC, UpU und des 5'-Mononukleotides GMP (10 mM Tris, pH 7,5)

Die Spektren der nicht basengepaarten Modellnukleotide zeigt Abb. 15. Die Dinukleotide haben ähnliche Spektren wie die für die Auswertung von Spektren verschiedener t-RNAs von G.J. Thomas²³ und von U. Schernau und Th. Ackermann²⁴ verwendeten

Mononukleotide. Die Bandenmaxima haben fast die gleiche Lage, die Extinktionskoeffizienten sind jedoch bis zu 15% verringert. Diese Spektren wurden als besser für die Spektrensimulationen angesehen, als die früher verwendeten, weil auch Polynukleotide diese Intensitätsverringering zeigen^{64,65} und das bei 80°C gemessene Spektrum von t-RNA^{Glu II} (E.coli), in dem keine Anteil: basengepaarter Regionen mehr erkennbar sind, durch diese Spektren besser simuliert werden kann, als durch die der Mononukleotide⁶⁶.

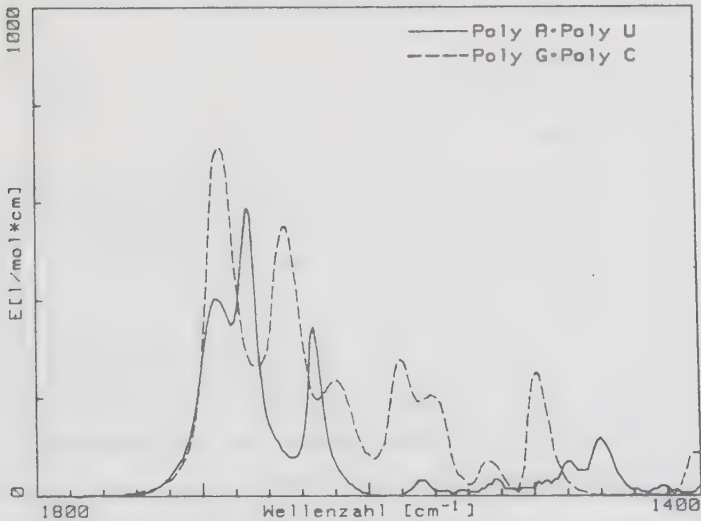


Abb. 16

Die IR-Spektren der doppelhelicalen Komplexe Poly A · Poly U und Poly G · Poly C (100 mM NaCl, 10 mM Tris, pD 7,5)

Bei der Bildung von Basenpaaren nach dem von J.D. Watson und F.H.C. Crick vorgeschlagenen Paarungsschema⁶⁷ ändert sich das gemessene IR-Spektrum drastisch^{68,69}. Die gemessenen Spektren (Abb. 16) sind im Rahmen der Meßgenauigkeit identisch mit den in den vorstehenden Arbeiten veröffentlichten.

3.2 Charakterisierung der synthetisierten Oligonukleotide und der kopolymeren Polynukleotide

3.2.1 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden synthetisiert:



Ihre Sequenz wurde bestimmt durch RNase-Spaltung, Trennung der Spaltprodukte durch Dünnschicht-Chromatographie und anschließende quantitative Auswertung mittels UV-Spektroskopie (siehe Kapitel 2.2.6).

Die IR-Spektren wurden im Bereich von 1800 cm^{-1} bis 1400 cm^{-1} gemessen und mit den simulierten Spektren verglichen. Die gefundene Abweichung ist so gering, daß die Sequenzen als bestätigt angesehen werden können. Veränderungen, die auf eine Strukturbildung der Oligonukleotide unter den für die folgenden Untersuchungen verwendeten Bedingungen hinweisen, können nicht beobachtet werden.

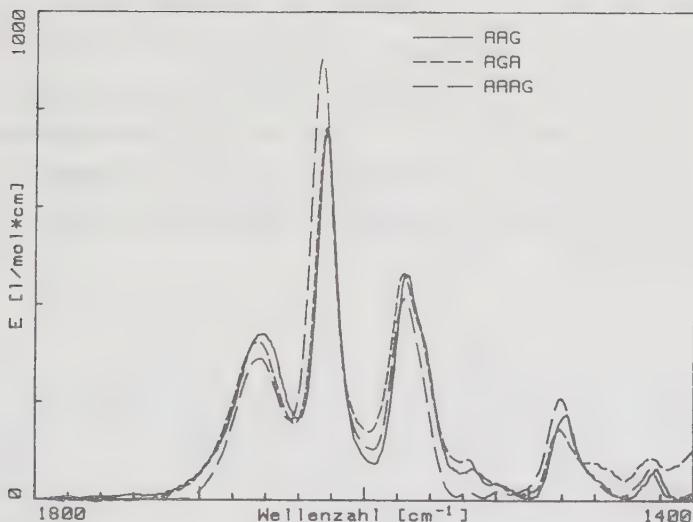


Abb. 17

Die IR-Spektren der synthetisierten Oligonukleotide (0,1 M NaCl, 10 mM Tris, pD 7,5)

3.2.2 Polynukleotide

Poly (A,G) und Poly (C,U) sind statistische Kopolymere, deren Basenzusammensetzung durch das in Kapitel 2.2.6 geschilderte Verfahren bestimmt wurde. Poly (A,G) enthält 40% G und 60% A. Das bei 20°C gemessene IR-Spektrum zeigt Abweichungen von dem für die entsprechende Zusammensetzung simulierten, die auf eine teilweise Assoziation der Guaninreste über Wasserstoffbrücken hindeuten könnten. Ähnliche Effekte treten im

Spektrum von Poly G⁵² und von basengepaarten Guanosinmononukleotiden auf^{70,71}. Die Intensität der Carbonylbande bei 1695 cm^{-1} ist deutlich erhöht, während die Intensität der Bande bei 1677 cm^{-1} , die einer Ringschwingung zugeordnet wird, niedriger erscheint, als nach dem simulierten Spektrum zu erwarten ist. Diese Änderungen im Spektrum werden mit zunehmender Temperatur geringer und sind bei 80°C nicht mehr zu beobachten.

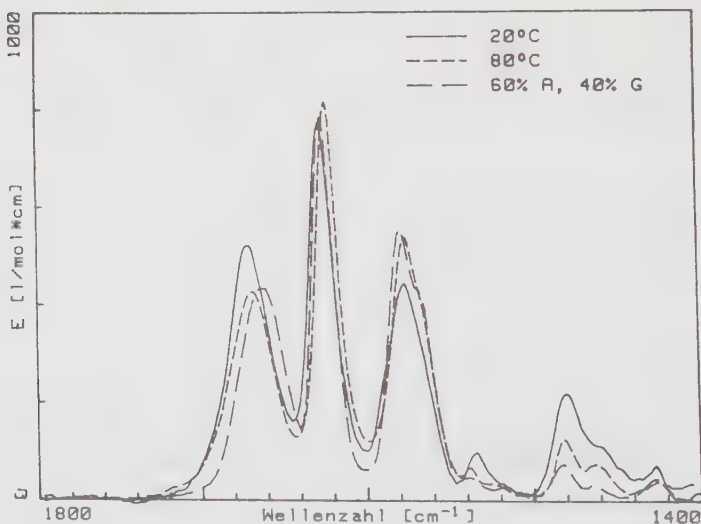


Abb. 18

Die IR-Spektren von Poly (A,G)
(0,1 M NaCl, 10 mM Tris, pD 7,5)

Die Basenzusammensetzung des Poly (C,U) wurde zu 70% C und 30% U bestimmt, was genau dem Verhältnis der in dem Synthesansatz vorgelegten Diphosphate entspricht. Das erwartete IR-Spektrum kann schon bei 20°C gemessen werden. Dieses Verhalten entspricht der Erwartung, daß Pyrimidinbasen weder eine ausgeprägte Tendenz zur Basenstapelung noch zu intermolekularer Strukturbildung infolge Wasserstoffbrückenbindung besitzen.

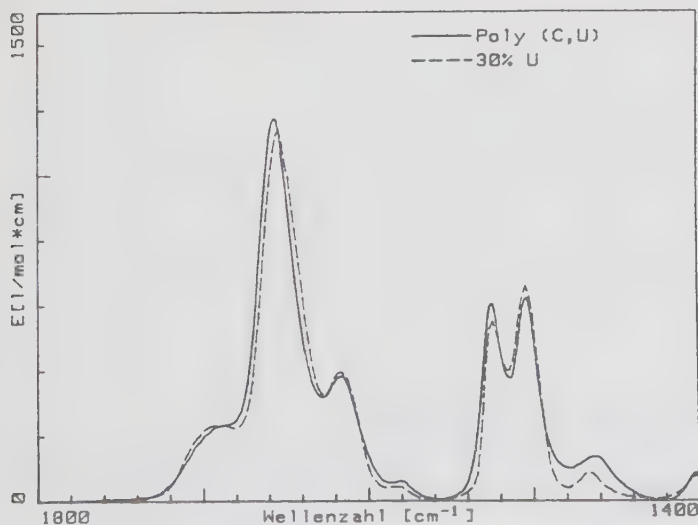


Abb. 19

Das IR-Spektrum des Poly (C,U)
(10 mM Tris, pH 7,5)

Die Kettenlänge beider statistischen Kopolymeren wurde durch Gelelektrophorese bestimmt. Der Polymerisationsgrad der Proben betrug für alle Messungen mit Ausnahme der NMR-Spektroskopie mehr als 100 Nukleotide. Damit ist gewährleistet, daß sich die Nukleotide wie solche mit unendlich hohem Polymerisationsgrad verhalten.

3.3 Charakterisierung tripelhelicaler Komplexe von Poly U und guaninhaltigen Adenyloligonukleotiden

3.3.1 Die Stöchiometrie der Komplexe

Im System Poly A/Poly U treten zwei geordnete Strukturen auf, die Doppelhelix mit einer Basenpaarung nach dem Modell von Watson und Crick⁶⁷ und die Tripelhelix, die eine zusätzliche Poly U-Kette enthält⁷². Oligonukleotide mit einem Guanylrest als 3'-Ende einer Adenylkette von mindestens drei Nukleotiden bilden nach UV-spektroskopischen Untersuchungen mit Poly U eine Tripelhelix, wobei der Guanylrest aus der Kette herausgefaltet ist^{60,73}.

Um das System Poly (A,G)/Poly U, das in Kapitel 3.4 beschrieben wird, besser charakterisieren zu können, wurden die Komplexe untersucht, die Poly U mit (Ap)₂G und mit ApGpA bildet. Beide Oligonukleotide eignen sich für solche Untersuchungen sehr gut, da sie beinahe das gleiche Basenverhältnis wie das untersuchte Poly (A,G) aufweisen und im Gegensatz zu diesem eine definierte Sequenz besitzen. Für die Bestimmung der Stöchiometrie der gebildeten Komplexe wurde die IR-Spektroskopie als Methode gewählt, da bei dieser Methode Aussagen über

verschiedene Teilbereiche des Moleküls möglich sind und wegen der niedrigen Umwandlungstemperaturen der Komplexe Konzentrationen von ca. 20 mM Nukleotidreste pro Liter Lösung verwendet werden müssen, die bei der sonst üblichen Methode der UV-Spektroskopie Schichtdicken von ca. $5\mu\text{m}$ erforderlich machen.

$(\text{Ap})_2\text{G}$ bildet wie seine Homologen mit längerer Adenylkette mit Poly U eine Tripelhelix ohne Beteiligung der Guanylstreste (Abb. 20).

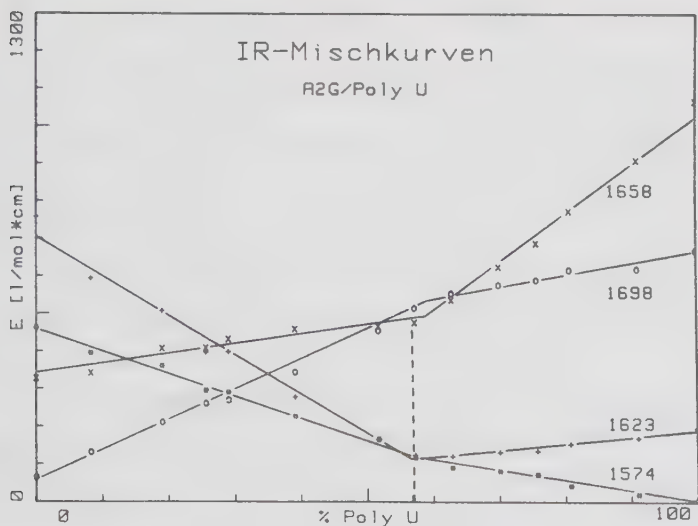


Abb. 20

IR-Mischkurven von $(\text{Ap})_2\text{G}$ und Poly U (1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5, 15°C)

Die hierfür berechnete Knickstelle im Mischungsdiagramm bei 57,1% Poly U-Gehalt wird bei 1698 cm^{-1} , 1658 cm^{-1} und 1623 cm^{-1} gefunden. Die Bande bei 1698 cm^{-1} ist in tripelhelicalen Komplexen deutlich ausgeprägt, eine Absorption in ihrer Nähe wird aber auch bei nicht gebundenem Uracil gefunden. Auch bei 1658 cm^{-1} findet man Beiträge mehrerer Banden des Guanins und des Uracils in wasserstoffbrückegebundener und in freier Form. Die Bande bei 1623 cm^{-1} wird dagegen vorwiegend von Adenin verursacht, geringe Beiträge stammen auch von einer Gerüstschwingung des Uracils. Die Bande bei 1574 cm^{-1} , die einer Gerüstschwingung des Guanins zugeordnet wird, zeigt im Gegensatz zu den übrigen kaum eine Abweichung von einer Geraden. Dies kann als weiterer Hinweis dafür gewertet werden, daß das Guanin in diesem Komplex nicht wasserstoffbrückegebunden vorliegt und weitgehend frei in die Lösung ragt. In doppelhelicalen Strukturen ist die Intensität dieser Bande drastisch verringert (siehe beispielsweise Abb. 16).

Auch ApGpA bildet mit Poly U einen tripelhelicalen Komplex unter Herausfaltung der Guaninreste (Abb. 21). Dies ist nicht unmittelbar zu erwarten, da in diesem Oligonukleotid das Guanin durch zwei benachbarte Adeninreste in seiner Bewegungsmöglichkeit gehindert wird. Dieses Verhalten nicht-komplementärer Basen wird jedoch auch in anderen Modellsystemen gefunden⁷⁴. Eine Bildung einer doppelhelicalen Struktur der untersuchten Oligonukleotide mit Poly U wird auch bei Verringerung der Salzkonzentration nicht beobachtet.

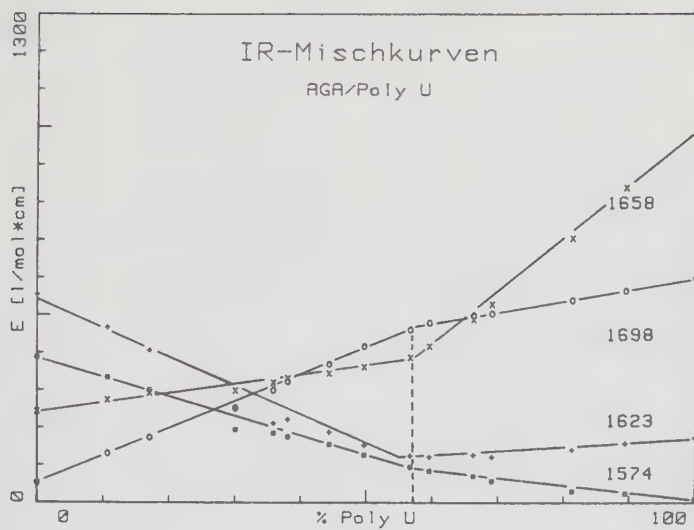


Abb. 21

IR-Mischkurven von ApGpA und Poly U (1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5, 15°C)

3.3.2 IR-spektroskopische Charakterisierung der tripelhelicalen Komplexe

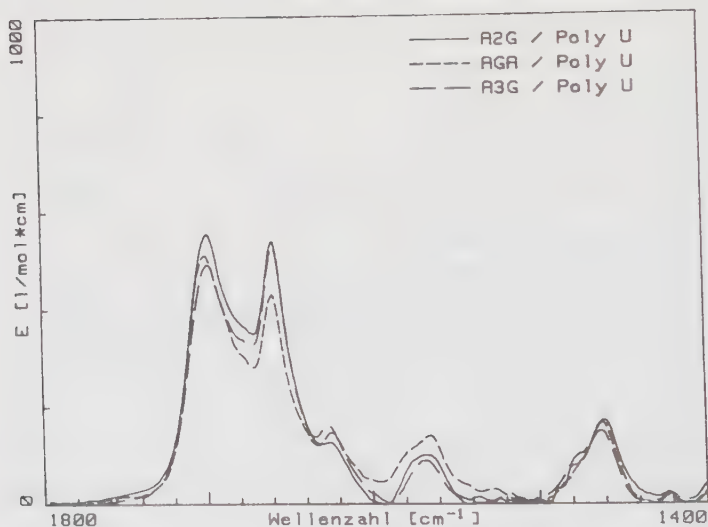


Abb. 22

Die IR-Spektren der tripelhelicalen Komplexe (1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5)

Die Spektren der Oligonukleotide (Ap)₂G, (Ap)₃G und ApGpA werden in Abb. 22 miteinander verglichen. Sie zeigen alle als charakteristische Merkmale zwei intensive Banden bei 1698 cm⁻¹ und bei 1659 cm⁻¹. Diese Banden werden auch im Spektrum des tripelhelicalen Poly A·2 Poly U⁷² und den Spektren der tripel-

helicalen Komplexe von Oligoadenylaten und Poly U unabhängig von der Kettenlänge des Oligonukleotides beobachtet⁶⁴. Die Intensität der Bande nahe 1625 cm^{-1} ist, wie nach den oben-erwähnten Untersuchungen zu erwarten ist, sehr gering.

Die Spektren der tripelhelicalen Komplexe von $(\text{Ap})_2\text{G}$ und von $(\text{Ap})_3\text{G}$ und Poly U sind sehr ähnlich. Geringe Intensitätsunterschiede der beobachteten Banden lassen sich auf die in den beiden Komplexen unterschiedlichen stöchiometrischen Anteile von gebundenem Guanin zurückführen. Im Unterschied dazu weist der Komplex des ApGpA bei 1659 cm^{-1} eine deutlich geringere Intensität auf als die beiden anderen und auch als die Spektren der tripelhelicalen Komplexe von Oligo A bzw. Poly A und Poly U. Dies ist wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Geometrie in den verschiedenen Komplexen zurückzuführen. Während ein am Ende einer Oligonukleotidkette befindlicher Guanylnrest ohne Störung der Anordnung der übrigen Basen aus der Tripelhelix herausgefaltet werden kann, ist dies für einen Guanylnrest in der Mitte einer Kette nicht möglich.

Die Möglichkeit, daß die beiden Adenylreste des ApGpA verschiedenen Helices angehören, scheidet aufgrund sterischer Überlegungen aus. In diesem Falle wäre auch zu erwarten, daß der Komplex aggregieren und ausfallen würde.

3.3.3 Kalorimetrische Messungen an den tripelhelicalen Komplexen

Die Kalorimetrie bietet eine Möglichkeit, die energetischen Wechselwirkungen der Basen direkt zu untersuchen. Durch den Einbau nichtkomplementärer Basen in AU₂-Tripelhelices wird die Helixgeometrie gestört. Die energetischen Auswirkungen dieser Störung können durch Vergleich der Umwandlungsenthalpien der tripelhelicalen Komplexe geeigneter Oligonukleotide mit Poly U gemessen werden.

Die Umwandlungsenthalpien der tripelhelicalen Komplexe von ApApG und von ApGpA sind aus Tabelle III zu entnehmen. Als Vergleichssubstanz mit ungestörter tripelhelicaler Geometrie wurde das Dinukleotid ApA verwendet. Es enthält die gleiche Anzahl von Adenylresten wie die Trinukleotide, unterscheidet sich von diesen jedoch außer in dem fehlenden Guanylrest noch zusätzlich durch eine fehlende negative Ladung. Die Umwandlungsenthalpien sind auf 1 mol AU₂ bezogen.

Tabelle III: Umwandlungsenthalpien der Oligonukleotid-Komplexe (1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5)

	C ^x [mmol/l]	T _m [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔH _{van't Hoff} [kJ/mol]	$\bar{n}$
ApA	10,9 (3,63)	37	60	215	3,6
ApApG	17,3 (4,94)	24,5	50	247	4,9
ApApG	49,0 (14,0)	30,5	46	278	6,0
ApGpA	14,5 (4,14)	18,5	39	279	7,2

^xGesamtbasenkonzentration, in Klammern ist die Konzentration der AU₂-Basentriplets angegeben.

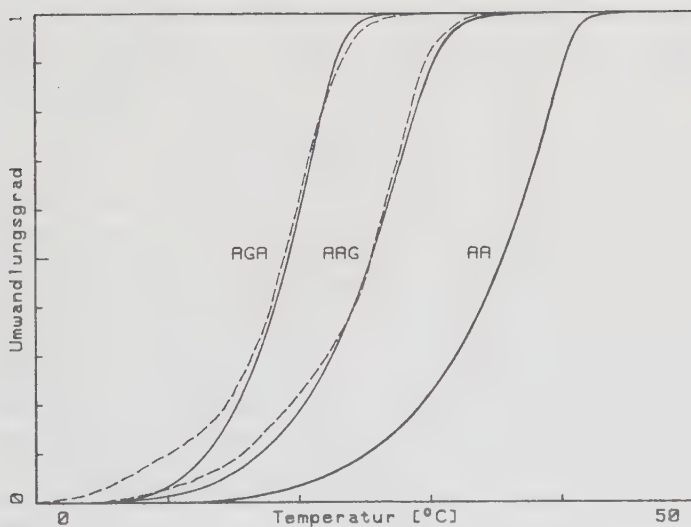


Abb. 23

Vergleich des kalorimetrisch (—) und IR_↑spektroskopisch durch die Änderung der Adenylbande bei 1623 cm^{-1} (----) bestimmten Umwandlungsgrades der Oligonukleotide ($c=10^{-17}\text{ mmol/l}$, 1 M NaCl , 10 mM Tris , $\text{pH } 7,5$)

Die Umwandlungstemperatur (T_m) der Trinukleotidkomplexe liegt wesentlich tiefer, als die des Dinukleotidkomplexes. Als Umwandlungstemperatur wird hier die Temperatur bezeichnet, bei der der Umwandlungsgrad $\Theta = 0,5$ ist. Der Effekt der Konzentrationsabhängigkeit der Umwandlungstemperatur ist bei einem Vergleich der Werte, die bei einer Basentriplettkonzentration von $\text{ca. } 4 \cdot 10^{-3}\text{ mol/l}$ gemessen wurden, nicht zu berücksichtigen. Erst bei einer Verdreifachung der Nukleotidkonzentration ergibt

sich eine Erhöhung der Umwandlungstemperatur um 6°C . Ähnliche Größenordnungen der konzentrationsbedingten Beeinflussung der Umwandlungstemperaturen von Oligonukleotidkomplexen wurden von F. Franck⁷⁶ gefunden. Die auf eine Basentriplettkonzentration von $4 \cdot 10^{-3}$ mol/l bezogenen Umwandlungstemperaturen weichen um weniger als 1°C von den angegebenen ab.

Die Effekte, die durch die zusätzliche Phosphatgruppe, und die, die durch die nichtkomplementäre Base verursacht werden, können durch die vorliegenden Messungen nicht unterschieden werden. Auffallend ist jedoch, daß die Umwandlungstemperatur des Komplexes von ApGpA um 6°C niedriger liegt als die des Komplexes von ApApG. Dies zeigt ebenso wie die IR-spektroskopisch gewonnenen Ergebnisse, daß die Helixgeometrie durch eine nichtkomplementäre Base in der Mitte eines Oligonukleotidstranges mehr gestört wird, als wenn diese sich am Ende der Kette befindet.

Man erhält den gleichen Befund beim Vergleich der Umwandlungsenthalpien der verschiedenen Komplexe. Die Umwandlungsenthalpie des Komplexes von ApGpA mit Poly U liegt um 9 kJ/mol niedriger als die des Komplexes von ApApG mit Poly U, die ihrerseits wieder um 12 kJ/mol niedriger liegt als der Wert von 60 kJ/mol für den Komplex des ApA mit Poly U. Der letztere Wert stimmt innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen von 10% mit den in der Literatur angegebenen Werten überein^{76,77}. Der relativ große experimentelle Fehler wird hauptsächlich durch die Lage der Grundlinie verursacht, die wegen der Breite der Umwandlungsbereiche von $20 - 30^{\circ}\text{C}$ Unsicherheiten aufweist. Beim Vergleich der Umwandlungsenthalpien ist kein Einfluß der

zusätzlichen negativ geladenen Phosphatgruppe zu berücksichtigen⁷⁶.

Umwandlungsenthalpien können prinzipiell temperaturabhängig sein, wenn die freigesetzten Nukleotide erhebliche Anteile einer gestapelten Konformation enthalten. In diesem Falle mißt man die Differenz der für die Bildung der statistisch geknäulten Endprodukte erwarteten Umwandlungsenthalpie und der Stapelungsenthalpie^{78,79}. Um sicherzustellen, daß derartige Effekte bei den durchgeführten Messungen keine Rolle spielen, wurde die Umwandlungsenthalpie des Komplexes von ApApG mit Poly U bei einer um den Faktor 3 erhöhten Nukleotidkonzentration noch einmal gemessen. Stapelungseffekte, die wegen der unter diesen Meßbedingungen erhöhten Umwandlungstemperatur zu einer größeren Umwandlungsenthalpie führen würden, existieren offensichtlich nicht.

3.4 Die Basenpaarung von Guanin und Uracil

3.4.1 Der doppelhelicale Komplex Poly (A,G) · Poly U

3.4.1.1 Die Stöchiometrie des Komplexes

Die Komplexbildung von statistisch kopolymeren Poly (A,G)-Proben mit unterschiedlichem Baseneinbauverhältnis und von Poly U wurde von M. Tsuboi et al.⁷⁵, E.K.F. Bautz et al.⁶⁰ und P. Doty et al.⁷³ mit Hilfe von UV-Spektroskopie und IR-Spektroskopie untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stehen untereinander nicht in voller Übereinstimmung. Bei der Interpretation der bei 259 nm aufgenommenen UV-Mischkurven wurde nicht berücksichtigt; daß die gewählte Wellenlänge die

Bildung doppelhelicaler Strukturen nicht erkennen läßt, wenn das gemessene System auch in der Lage ist, eine Tripelhelix zu bilden⁵⁹ (siehe auch Abb. 8). Deswegen wurde das System Poly (A,G)/Poly U noch einmal untersucht. Um die Effekte, die durch eine mögliche Basenpaarung von Guanin und Uracil verursacht werden, möglichst genau messen zu können, wurde für die Messungen ein Kopolymeres mit dem relativ hohen Anteil von 40% Guanin verwendet.

Diskutiert man die Existenzmöglichkeit verschiedener Strukturen, so wird man vor allem die aus dem Poly A/Poly U-System bekannten Komplexe mit tripelhelicaler und mit doppelhelicaler Struktur zu beachten haben, da Adenin den Hauptbestandteil der Poly (A,G)-Kette bildet. Außerdem hat man für jede Struktur zwei Extremfälle zu berücksichtigen; die Guanylstücke können einen Platz in der Helix beanspruchen, oder sie können aus der Helix herausgefaltet werden. Die für diese insgesamt vier Extremfälle berechneten stöchiometrischen Anteile von Poly U im Komplex sind:

37,5% für eine Doppelhelix ohne Beteiligung des Guanosins

50% für eine Doppelhelix mit Beteiligung des Guanosins

54,5% für eine Tripelhelix ohne Beteiligung des Guanosins

66,7% für eine Tripelhelix mit Beteiligung des Guanosins

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß die Nachbarschaft von Guanylstücken einzelne AU-Basenpaare soweit destabilisiert, daß zusätzlich zu den Guanylstücken ein Teil der Adenylreste aus der Helix herausgefaltet wird. Obwohl dieser Fall als ziemlich unwahrscheinlich zu betrachten ist, wird er in dem folgenden Kapitel 3.4.1.1 diskutiert.

Zur Bestimmung der Stöchiometrie des Komplexes wurden Mischungs-
experimente unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Als
Beispiel zeigt Abb. 24 die bei 260 nm gemessene Extinktion ver-
schiedener Mischungen mit 0,1 mM Gesamtbasenkonzentration.

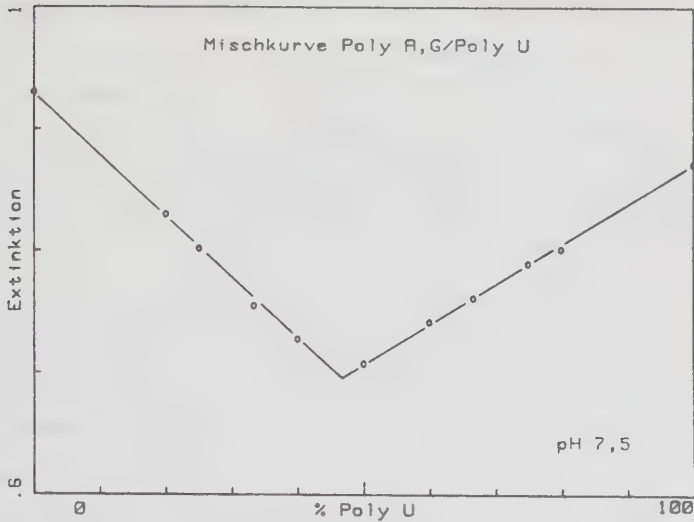


Abb. 24

UV-Mischkurve von Poly(A,G) und Poly U
(0,1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5 , 20°C)

Unter allen gewählten Bedingungen (Temperatur 0-20°C, 10 mM-
500 mM NaCl, pH 6-8) wurde aus den aufgenommenen Kurven die
Bildung eines Komplexes ersichtlich, der 50-53% Poly (A,G)
und 47-50% Poly U enthält. Die Bildung eines tripelhelicalen
Komplexes konnte nicht beobachtet werden. Die Hypochromizität

von 30% entspricht der, die man in dem gewählten Diagramm für die Bildung einer Doppelhelix erwartet.

Versuche, bei höherer NaCl-Konzentration als 0,5 mol/l die Messungen zu wiederholen, waren nicht möglich, da unter diesen Bedingungen Poly(A,G) keine genügend hohe Löslichkeit aufweist. Es ist jedoch möglich, vorher mit einem geeigneten Verfahren gebildetes doppelhelicales Poly (A,G) · Poly U unter diesen Bedingungen zu lösen und zu untersuchen (siehe folgende Kapitel).

Um die Beiträge der einzelnen Basen besser erfassen zu können, wurden die Mischungsexperimente wiederholt und die IR-Absorption der Lösungen in D₂O gemessen (Abb. 25).

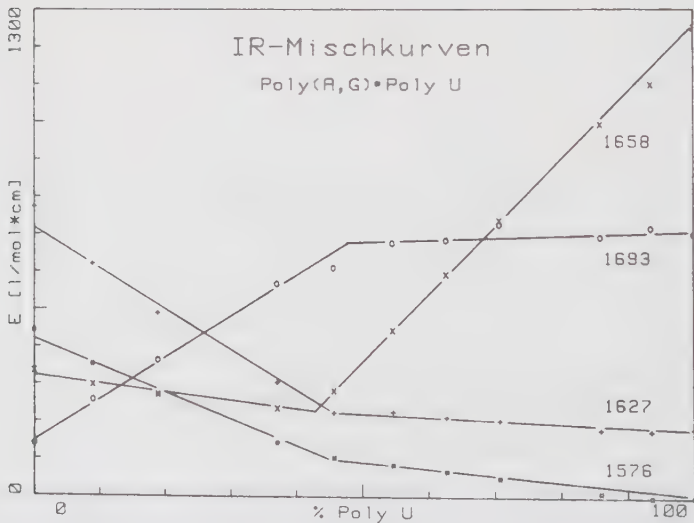


Abb. 25

IR-Mischkurve von Poly (A,G) und Poly U
(0,1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5)

Auch hier sind deutliche Knickstellen im Bereich zwischen 45% und 50% Poly U-Gehalt zu beobachten. Wichtig ist vor allem, daß auch die bei 1576 cm^{-1} aufgenommene Kurve, die fast ausschließlich Beiträge einer Ringschwingung des Guanins enthält, eine gut erkennbare Knickstelle aufweist und sich ebenso verhält, wie die bei 1627 cm^{-1} erhaltene Kurve, die hauptsächlich einer Ringschwingung des Adenins entspricht, und die bei 1658 cm^{-1} und 1693 cm^{-1} gemessenen Kurven, die jeweils Beiträge mehrerer Carbonylschwingungen enthalten. Im Gegensatz zu den in Kapitel 3.3 beschriebenen tripelhelicalen Oligonukleotidkomplexen ist im Falle des Poly (A,G) also der Guanylnrest offensichtlich an der Komplexbildung mitbeteiligt.

Die gemessenen Kurven zeigen eine Komplexbildung mit einem Anteil von 50% Poly (A,G) und 50% Poly U. Die einfachste Erklärung hierfür ist die Bildung einer Doppelhelix, bei der möglicherweise einige wenige Guaninreste an der Basenpaarung nicht teilnehmen und aus der Doppelhelix herausgefaltet werden. Dies ist mit dem statistisch kopolymeren Charakter des Poly (A,G) zu erklären. Es existieren in dem Molekül auch längere ununterbrochene Guaninsequenzen, die wegen der zu erwartenden gegenüber einem AU-Basenpaar geringeren Stabilität des GU-Basenpaares möglicherweise an der Helixbildung nicht teilnehmen. Mit steigender Konzentration des Poly U nimmt der Anteil der gebundenen Guanylnreste zu, so daß man davon ausgehen kann, daß bei einem Gehalt von 50% Poly U eine weitgehend vollständige Basenpaarbildung auftritt.

Die Bildung einer tripelhelicalen Struktur kann unter den angegebenen Bedingungen nicht beobachtet werden. Das empfindlichste

Kriterium hierfür ist die bei 260nm aufgenommene UV-Mischkurve, die bei der möglichen Existenz beider Komplexe in einem A/U-System nur die Bildung des tripelhelicalen Komplexes anzeigen würde (siehe entsprechende, unter gleichen Bedingungen aufgenommene UV-Mischkurve von Poly A und Poly U, Abb. 8).

Sowohl die IR- als auch die UV-Messungen deuten darauf hin, daß sich bei niedrigen NaCl-Konzentrationen in dem System Poly (A,G)/Poly U nur ein einziger Komplex bildet, der die für eine Doppelhelix erwarteten Eigenschaften besitzt.

3.4.1.2 IR-spektroskopische Charakterisierung des doppelhelicalen Komplexes

Die gefundene Stöchiometrie des Komplexes ist auch mit der ziemlich unwahrscheinlichen Annahme zu vereinbaren, daß es sich um eine Tripelhelix handelt, bei der 50% des Poly (A,G) nicht an der Komplexbildung beteiligt sind. Dies wäre beispielsweise der Fall wenn alle Guanylstämme und 20% der Adenylreste aus der Helix herausgefaltet würden. Andere Möglichkeiten, die zuließen, daß der Anteil der herausgefalteten Adenylreste größer und der der herausgefalteten Guanylstämme entsprechend kleiner werden, brauchen nicht berücksichtigt zu werden, da die Wechselwirkung komplementärer Basen sicherlich größer ist als die nichtkomplementärer Basen.

Zum Vergleich eignen sich besonders die in Kapitel 3.3 behandelten Oligonukleotidkomplexe, da sie fast das gleiche Verhältnis von Adenin zu Guanin aufweisen wie das untersuchte Poly (A,G). In Abb. 26 werden die Spektren gezeigt, die man erhält, wenn

man je 50% der Adenyl-guanyl-nukleotide und 50% Poly U mischt. In den tripelhelicalen Oligonukleotidkomplexen liegt bei diesem Mischungsverhältnis ein Teil des Oligonukleotides ungebunden vor.

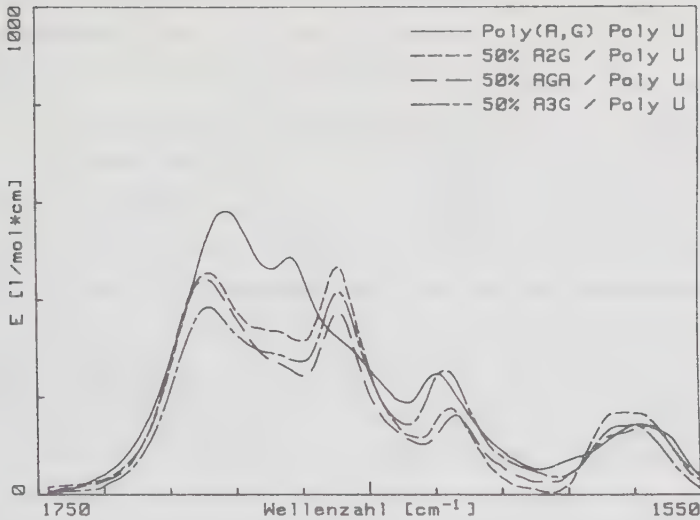


Abb. 26

IR-Spektren von Mischungen aus 50% Adenyl-guanyl-nukleotid und 50% Poly U (0,1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5)

In allen Spektren der tripelhelicalen Komplexe findet man die charakteristischen Merkmale der IR-Spektren von AU_2 -Tripelhelices. Im Spektrum des Poly (A,G) · Poly U dagegen fehlt die Bande in der Nähe von 1660 cm^{-1} . Die Bande bei 1698 cm^{-1} ist durch eine intensivere bei 1693 cm^{-1} ersetzt, und statt der

relativ schwachen Schulter bei 1677 cm^{-1} findet man eine deutliche Bande bei 1673 cm^{-1} , die fast die gleiche Lage einnimmt wie die der $C_4=O$ -Streckschwingung des Uracils zugeordnete Bande des doppelhelicalen Poly A · Poly U bei 1672 cm^{-1} . (Die in diesem Kapitel vorgenommenen Bandenzuordnungen sind der Mitteilung von Tsuboi et al.⁸⁰ entnommen). Das ebenfalls eingezeichnete Spektrum des tripelhelicalen Komplexes von $(Ap)_3G$ mit Poly U zeigt, daß das gemessene Spektrum nur sehr wenig von dem relativen Anteil der Guanylreste im Oligonukleotid abhängt. Der Vergleich des experimentellen Spektrums mit denen tripelhelicaler Vergleichssysteme deutet also ebenso wie die gefundene Stöchiometrie auf eine doppelhelicale Struktur des Komplexes hin.

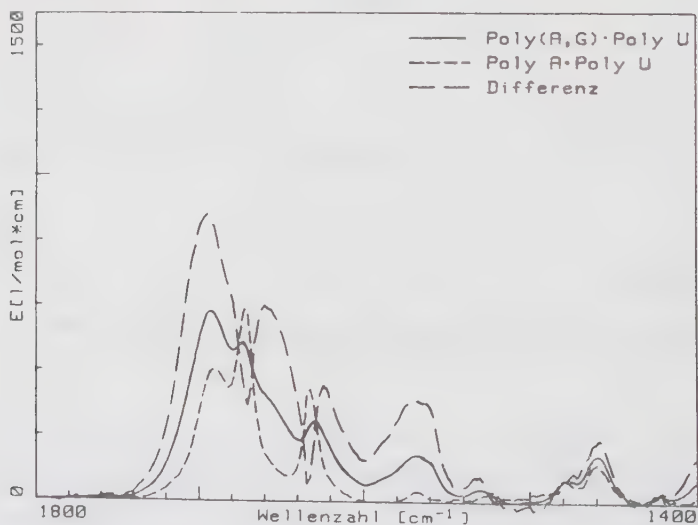


Abb. 27

Vergleich der Spektren von Poly (A,G) · Poly U und von Poly A · Poly U (0,1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5)

Abb. 27 zeigt einen Vergleich der Spektren von Poly (A,G)·Poly U und von Poly A · Poly U . Hier ist deutlich die Auswirkung der GU-Basenpaarbildung zu erkennen. Die Intensität ist im Carbonylbereich in der Nähe von 1690 cm^{-1} und von 1660 cm^{-1} gegenüber dem Spektrum des Poly A · Poly U deutlich erhöht. Dieser Effekt wird besonders deutlich, wenn man vom Spektrum des Poly (A,G) · Poly U den stöchiometrischen Anteil von 60% des Spektrums von Poly A · Poly U abzieht und die Differenz wieder auf 1 mol Base normiert. Dies ergibt das erwartete Spektrum eines GU-Basenpaares, wobei man beachten muß, daß die direkte Nachbarschaft unterschiedlicher Basenpaare in der Doppelhelix das Spektrum eines AU-Basenpaares beeinflussen kann und solche kleinen spektralen Veränderungen zu großen Unsicherheiten im Differenzspektrum führen können. Die einzige Möglichkeit, die Größe solcher Einflüsse abzuschätzen, besteht darin, die Umgebung des Basenpaares zu ändern und zu überprüfen, ob sich dabei das GU-Spektrum erheblich ändert. Deswegen wird im folgenden Kapitel auch das IR-Spektrum des Poly G · Poly (C,U) und somit das Spektrum des GU-Basenpaares in einer GC-Doppelhelix untersucht und mit den hier gewonnenen Ergebnissen verglichen.

Zunächst sollen der Komplex Poly (A,G) · Poly U genauer charakterisiert und seine thermischen Eigenschaften untersucht werden. Der Komplex wird durch Temperaturerhöhung zerstört (Abb. 28). Bei der Temperatur von 60°C erhält man ein Spektrum, das dem simulierten Spektrum aus Anteilen der Spektren von 30% ApA, 20% GMP und 50% UpU entspricht. Bei dieser Temperatur liegen die Polynukleotidketten als statistische Knäuel ohne Sekundärstruktur vor.

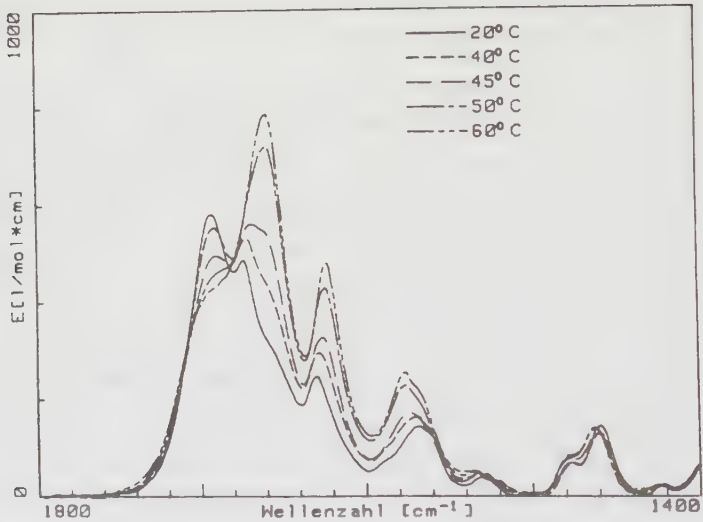


Abb. 28

Spektren des Poly (A,G) · Poly U bei verschiedenen Temperaturen (0,2 M NaCl, 10 mM Tris, pD 7,5)

Für einen Helix-Knäuel-Übergang, der durch einen reinen Einstufenprozeß beschrieben werden kann, erwartet man das Auftreten isosbestischer Punkte. Ein solcher isosbestischer Punkt sollte vor allem gut zu beobachten sein, wo sich die verschiedenen Kurven deutlich schneiden und nicht nur berühren, bei den in Abb. 27 gezeigten Spektren also in der Nähe von 1680 cm^{-1} . Um dieses Problem lösen zu können, wurden die Spektren sehr

sorgfältig registriert. Die gezeigten Spektren wurden aus drei unabhängigen Messungen, deren Abweichungen voneinander kleiner als $50 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$ waren, durch Mittelung erhalten. Jede Einzelmessung wurde nach dem Time-averaging-Verfahren mit zehn Durchgängen bei einem Signal-Rauschverhältnis der Einzelmessung von etwa $100 : 1$ erhalten.

Bei jeder Einzelmeßreihe verschob sich der Schnittpunkt um etwa 5 cm^{-1} in seiner Frequenzlage und um etwa $40 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$ in seiner Intensitätslage, wobei die Verschiebung stets in der gleichen Richtung verlief. Obwohl die Verschiebung eine ähnliche Größenordnung hat wie der experimentelle Fehler, muß deswegen angenommen werden, daß sich bei 1680 cm^{-1} kein isobestischer Punkt befindet, und somit Zwischenzustände bei der thermischen Denaturierung mitbeteiligt sind.

Zwei Deutungen für mögliche Zwischenzustände können mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Eine tripelhelicale Struktur bildet sich während der thermischen Umwandlung bei niedrigen Salzkonzentrationen nicht. Diese hätte zur Folge, daß sich die Intensität der für eine AU-Doppelhelix charakteristischen Bande bei 1673 cm^{-1} zugunsten einer für eine AU_2 -Tripelhelix charakteristischen Bande nahe 1660 cm^{-1} verringern würde⁸¹. Die Intensität nimmt jedoch an beiden Stellen des Spektrums durch die Bildung der ungebundenen Uracyl- und Guanylstoffe kontinuierlich zu.

Die weitere Möglichkeit, daß die thermodynamisch stabileren AU-Basenpaare im Mittel erst bei höherer Temperatur getrennt werden als die GU-Basenpaare, kann ebenfalls ausgeschlossen

werden. Trägt man die an charakteristischen Stellen des Spektrums gemessenen Extinktionskoeffizienten gegen die Temperatur auf (Abb. 29), so erkennt man deutlich, daß alle Übergänge bei der gleichen Temperatur stattfinden.

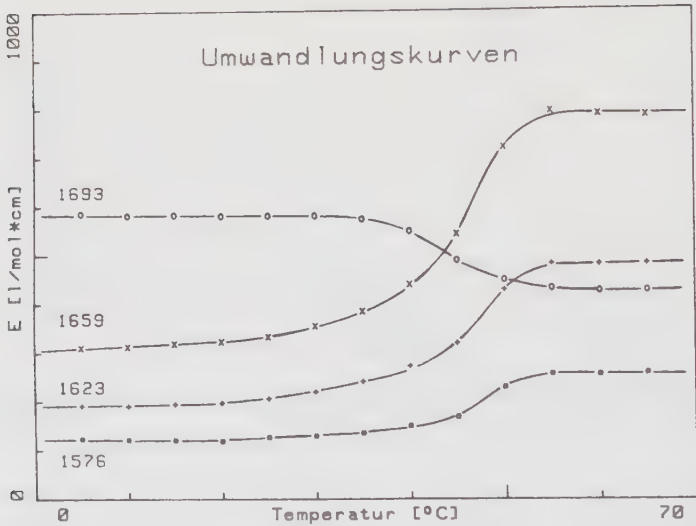


Abb. 29

Änderung der IR-Extinktionskoeffizienten bei thermischer Umwandlung des Poly (A,G) · Poly U
(0,2 M NaCl, 10 mM Tris, pD 7,5)

Während die bei 1693 cm^{-1} und bei 1659 cm^{-1} gemessenen Extinktionskoeffizienten jeweils Beiträge mehrerer Carbonylschwingungen enthalten und somit als charakteristisch für das Verhalten des gesamten Moleküls angesehen werden können, ist die Bande bei 1623 cm^{-1} fast ausschließlich einer Ringschwingung

des Adenins zuzuordnen und die bei 1576 cm^{-1} einer Ringschwingung des Guanins.

Die Intensität der Bande des Guanins wird beim Übergang von der Doppelhelix zum statistischen Knäuel fast verdoppelt. Dieser Unterschied ist von ähnlicher Größenordnung wie der aus Abb. 15 und Abb. 16 ersichtliche Unterschied der Intensität der entsprechenden Banden des GMP und des Poly G · Poly C. Dieser Sachverhalt ist ein weiterer Hinweis dafür, daß jeder Guanylnrest nicht nur einen Platz in der Doppelhelix belegt, sondern auch in der Form eines Basenpaares gebunden vorliegt.

Vergleicht man die Umwandlungskurven mit denen von Poly A · Poly U⁸¹, so fällt auf, daß nicht nur die Umwandlungstemperatur niedriger liegt, sondern daß auch der Umwandlungsbereich erheblich breiter ist. Dies deutet auf eine kleinere kooperative Einheit im Falle des Poly (A,G) · Poly U hin⁸². Im Umwandlungsbereich der Doppelhelix liegen also relativ kurze doppelhelicale Bereiche und ebenfalls relativ kurze ungepaarte Bereiche vor. Die spektralen Eigenschaften der Übergangsstellen von doppelhelicalen zu ungepaarten Teilen des Moleküls sind nicht mehr zu vernachlässigen wie im Falle des hochkooperativen Helix-Knäuel-Überganges von Poly A · Poly U, sie können dazu führen, daß isosbestische Punkte nicht zu beobachten sind. Daß geringfügige lokale Unterschiede der Helixgeometrie zu spektralen Unterschieden führen können, wurde in Kapitel 3.3.2 am Beispiel der tripelhelicalen Komplexe von ApApG bzw. von ApGpA mit Poly U gezeigt.

Das IR-Spektrum des Poly (A,G) · Poly U ist unterhalb der Umwandlungstemperatur nur sehr wenig von der Konzentration von

zugefügtem NaCl abhängig. Es treten keine Frequenzverschiebungen im Konzentrationsbereich von 10 mM bis 0,5 M NaCl auf. Die Unterschiede der verschiedenen Bandenintensitäten betragen maximal ± 50 l/mol $\cdot$ cm (10% bezogen auf die intensivste Bande). Während bei NaCl-Konzentrationen bis zu 0,5 mol/l stets wieder der Ausgangskomplex zurückgebildet wird, wenn man nach einer thermischen Umwandlung die Lösung wieder abkühlt, unterscheidet sich das Spektrum einer derartig behandelten Lösung bei höherer NaCl-Konzentration vom anfänglich erhaltenen Spektrum des doppelhelicalen Komplexes (Abb. 30).

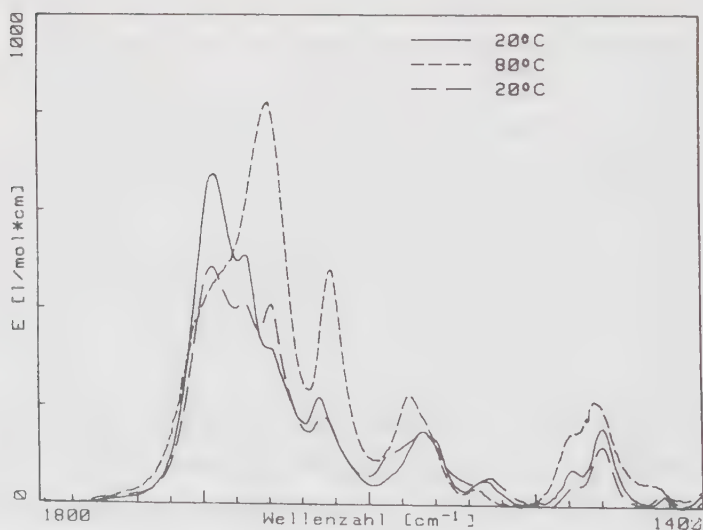


Abb. 30

Die IR-Spektren des Poly (A,G) $\cdot$ Poly U, die bei 20°C, 80°C und nach Abkühlen der Lösung bei 20°C gemessen werden (1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5)

Eine ähnliche Beobachtung wurde von Tsuboi et al.⁷⁵ bei einer Messung an einem Komplex von Poly U und Poly (A,G) mit einem Guanosingehalt von 30% gemacht. Die Qualität der erhaltenen Spektren erlaubte jedoch keine Erklärung der spektralen Veränderungen.

Der Vergleich des nach dem Wiederabkühlen der Lösung erhaltenen Spektrums zeigt charakteristische Merkmale tripelhelicaler Komplexe. Die Bande bei 1658 cm^{-1} ist intensiver geworden und die Bande bei 1693 cm^{-1} ist nach 1698 cm^{-1} verschoben und in ihrer Intensität abgeschwächt. Ein Vergleich der Intensitäten dieser beiden Banden, die in dem weiter unten diskutierten Spektrum der reinen Tripelhelix annähernd gleich sind, läßt jedoch den Schluß zu, daß Teile der Polynukleotide auch in doppelhelicalen Strukturen vorkommen. Da eine genaue quantitative Behandlung der Strukturen, die nach Wiederabkühlen der Lösungen erhalten werden, für die folgenden Messungen nicht wichtig ist, soll hier nur die qualitative Feststellung getroffen werden, daß bei NaCl-Konzentrationen von 0,5 mol/l bis 1 mol/l die Stabilität der Doppelhelix stark abnimmt und vorwiegend eine Tripelhelix gebildet wird.

Ähnliches geschieht auch beim Stehenlassen der Lösung des doppelhelicalen Komplexes bei Raumtemperatur. Im Verlaufe einiger Tage ändert sich das Spektrum des gelösten Komplexes und wird dem des tripelhelicalen Komplexes immer ähnlicher.

Im Unterschied zu dem System Poly A/Poly U ist in dem behandelten System Poly (A,G)/Poly U also das Mengenverhältnis der Komponenten in der Lösung bei Raumtemperatur nicht entscheidend für die Art des gebildeten Komplexes, sondern nur

die Salzkonzentration in der Lösung. In Lösungen mit einer NaCl-Konzentration unter 0,5 M ist die Doppelhelix stabil, bei höheren Salzkonzentrationen wird sie metastabil und wandelt sich in die nun stabile Tripelhelix um.

Von dem System Poly A/Poly U ist bekannt, daß bei NaCl-Konzentrationen, die über 0,1 mol/l liegen, die thermisch induzierte Umwandlung des doppelhelicalen Komplexes über die Zwischenstufe einer Tripelhelix verläuft⁷⁸. Ähnliches kann man bei Poly (A,G) · Poly U bei NaCl-Konzentrationen über 0,5 mol/l beobachten.

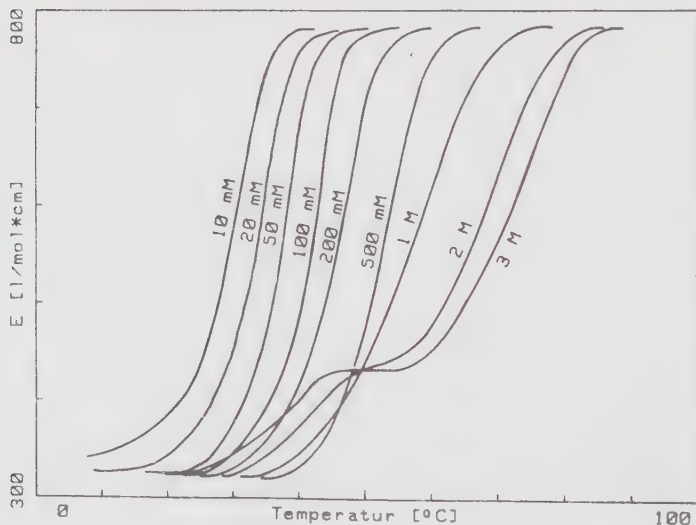


Abb. 31

Die bei 1659 cm^{-1} registrierten Umwandlungskurven des Poly (A,G) · Poly U. Die NaCl-Konzentration ist jeweils angegeben (1 mM Tris, pD 7,5)

Die bei 1659 cm^{-1} registrierte Umwandlungskurve wird zunächst verbreitert und läßt schließlich bei weiter erhöhten NaCl-Konzentrationen eine deutliche Zwischenstufe erkennen. Das Spektrum dieses intermediär gebildeten Komplexes (Abb. 32) besitzt alle bereits diskutierten charakteristischen Eigenschaften einer Tripelhelix.

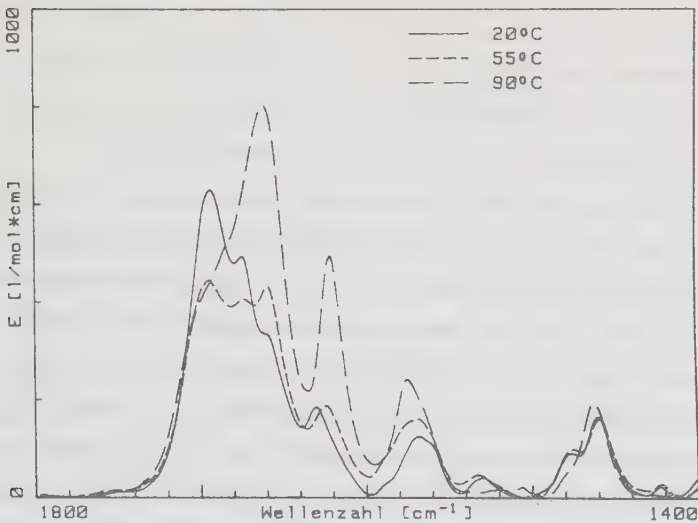


Abb. 32

Die IR-Spektren des Poly (A,G) · Poly U
(2 M NaCl, 10 mM Tris, pD 7,5)

Die Existenzbereiche der verschiedenen Komplexe und ihr thermisches Verhalten werden zusammenfassend im Kapitel 3.4.1.5 dargestellt.

3.4.1.3 NMR-spektroskopische Messungen an Poly (A,G) · Poly U

Für das GU-Basenpaar werden im NMR-Spektrum zwei Resonanzlinien zwischen -10 und -12 ppm (2,2 - Dimethyl - 2 - silapentan - 5 - sulfonat als Standard) erwartet, die den beiden wasserstoffbrückengebundenen Protonen dieses Basenpaares entsprechen. Diese Resonanzen konnten im Spektrum des Poly (A,G) · Poly U jedoch nicht beobachtet werden. Die dem AU-Basenpaar entsprechende Linie ist gegenüber den Linien einer unter den gleichen Bedingungen gemessenen Probe des Poly G · Poly (C,U) um einen Faktor 4 verbreitert.

Aus allen weiteren in diesem Kapitel beschriebenen Messungen geht deutlich hervor, daß das GU-Basenpaar gebildet wird und unter den für die Messungen gegebenen Bedingungen stabil ist. Als Erklärung für die NMR-spektroskopischen Befunde kann angenommen werden, daß durch kurzzeitige Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen des GU-Basenpaares die in diese Bindung involvierten Protonen schnell mit den Protonen des Wassers austauschen. Dabei kommt es offensichtlich zu einer so starken Austauschverbreiterung, daß das Signal nicht mehr beobachtet werden kann. Dies kann dazu führen, daß auch die Resonanzlinien benachbarter AU-Basenpaare über kooperative Effekte austauschverbreitert sind.

Konsistent mit dieser Erklärung ist die beobachtete geringe kooperative Länge bei der thermisch induzierten Umwandlung des Komplexes.

3.4.1.4 Kalorimetrische Messungen an Poly (A,G) • Poly U

Im folgenden Kapitel sollen die Ergebnisse kalorimetrischer Messungen der doppelhelicalen Komplexe Poly (A,G) • Poly U und Poly A • Poly U miteinander verglichen werden. Damit kann die energetische Auswirkung der GU-Basenpaarung direkt und ohne weitere Annahmen, wie sie bei der Interpretation optischer Umwandlungskurven notwendig sind, mit hoher Genauigkeit bestimmt werden.

Obwohl über das System Poly A • Poly U eine Reihe genauer kalorimetrischer Messungen vorliegen^{78,79,83-86}, wurden auch die Enthalpieänderungen, die mit der thermisch induzierten Umwandlung dieses Systems verbunden sind, neu bestimmt. Hiermit sollte gewährleistet werden, daß die erhaltenen Werte miteinander vergleichbar sind und nicht durch systematische Abweichungen verfälscht werden.

Die Enthalpieänderungen beider Systeme hängen von der Ionenstärke der verwendeten Lösung und damit von der Umwandlungstemperatur T_m ab. Bei niedriger Temperatur ist Poly A in der Lage, eine durch Stapelungswechselwirkungen stabilisierte Einstranghelix zu bilden⁸⁷. Dadurch wird die Umwandlungsenthalpie der AU-Basenpaare in die vollständig getrennten Basen um die Stabilisierungsenthalpie des bei der Umwandlungstemperatur vorliegenden Anteils des gestapelten Poly A verringert. Die thermisch induzierte Umwandlung des Poly A verläuft über das verglichen mit anderen Umwandlungen sehr große Temperaturintervall von etwa -20°C bis 90°C ⁸⁷. Deshalb wird jede experimentell meßbare thermisch induzierte Umwand-

lung des Poly A • Poly U in ihrer Umwandlungsenthalpie von diesem Effekt in unterschiedlichem Maße betroffen. Ähnliche Stabilisierungsmöglichkeiten sind auch für das Poly (A,G) zu erwarten, so daß prinzipiell eine Korrektur der gemessenen Werte auf den Zustand statistisch geknäuelter Polynukleotidstränge notwendig ist. Dies kann durch weitere kalorimetrische Messungen der Umwandlungsenthalpien von Poly A und von Poly (A,G) erreicht werden⁸⁶. Die Gesamtenthalpieänderungen für Poly A wurde zu 14 kJ/mol Base aus der kalorimetrischen Umwandlungskurve abgeschätzt. Trotz der wegen der Breite der Umwandlung unsicheren Lage der Grundlinie ist dieser Wert in bemerkenswert guter Übereinstimmung zu dem von V.V. Filimonov und P.L. Privalov⁸⁶ gemessenen Wert von 12,6 kJ/mol. Für das Poly (A,G) ergibt sich im Bereich von 0°C bis 100°C die analog bestimmte Enthalpieänderung von 21 kJ/mol Base. Dieser Wert kann, wie ein Vergleich mit den IR-spektroskopischen Ergebnissen zeigt (siehe Kapitel 3.2.2), durch Assoziationen des Polynukleotides über Wasserstoffbrücken, die bei tiefen Temperaturen möglich sind, mit beeinflusst werden, so daß hier nicht die reine Stapelungsenthalpie bestimmt wurde. Dies ist jedoch für die Korrektur der gemessenen Werte unerheblich, da lediglich die Größe der Wechselwirkungen, nicht aber deren molekulare Ursache in die Rechnung eingeht. Aus dem gleichen Grunde ist auch unerheblich, daß aus meßtechnischen Gründen die Umwandlungsenthalpie nur ab 0°C bestimmt werden konnte. Der bei tieferer Temperatur liegende Anteil der Umwandlungsenthalpie ist zumindest im Falle des Poly A sehr klein^{86,87}, und wird, wie im folgenden gezeigt wird, für die Umrechnung nicht benötigt.

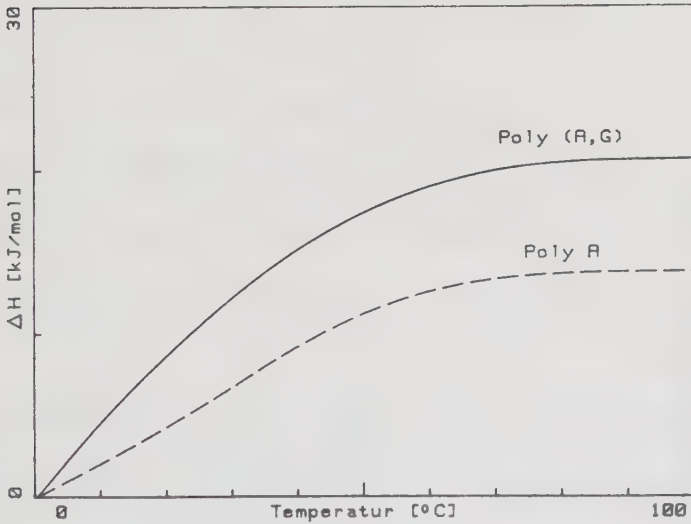


Abb. 33

Die Umwandlungsenthalpien von Poly A und von Poly (A,G)
(0,1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5)

Die thermisch induzierte Umwandlung der Einstranghelices wurde auch optisch verfolgt. Die bei 260 nm gemessenen Umwandlungskurven sind im Konzentrationsbereich von 10 mM NaCl bis 500 mM NaCl, in dem mehrere Umwandlungen untersucht wurden, nicht von der Ionenstärke der verwendeten Lösung abhängig. Deshalb können die gemessenen Umwandlungsenthalpien mit jeweils einer kalorimetrischen Messung korrigiert werden, eine Salzabhängigkeit existiert nicht.

Die Korrektur der Umwandlungsenthalpien des Poly A • Poly U

wurde nach der folgenden Gleichung vorgenommen:

$$\Delta H(AU) = \Delta H(AU)_{\text{gem.}} + \int_{T_m}^{100^{\circ}\text{C}} C_p(A) dT$$

wobei $\Delta H(AU)_{\text{gem.}}$ die gemessene Umwandlungsenthalpie symbolisiert. $C_p(A)$ ist der gemessene Anteil der Molwärme des Systems, der der Konformationsänderung des Poly A zuzuschreiben ist. Die obere Grenze von 100°C wurde gewählt, da bei dieser Temperatur die Umwandlung des Poly A sicher beendet ist (siehe Abb. 33). Die Umwandlungsenthalpie des Poly (A,G) · Poly U wurde analog korrigiert.

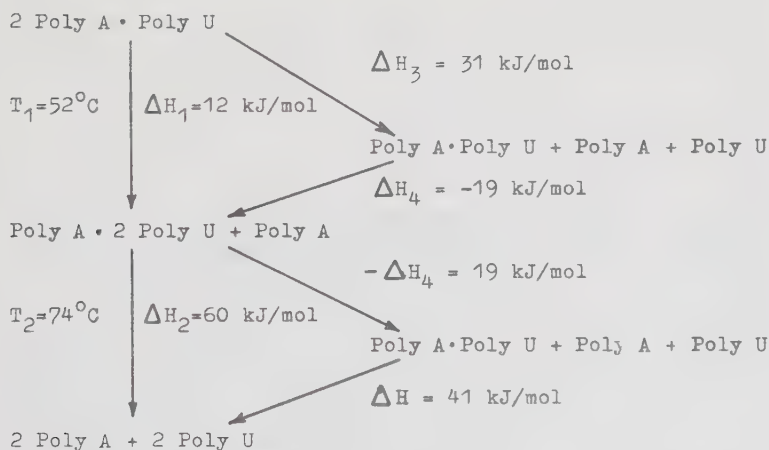
Um einen möglichst großen Temperaturbereich beschreiben zu können, wurde die NaCl-Konzentration variiert. Bei Erhöhung der Salzkonzentration wird die Umwandlungstemperatur erhöht. In beiden Systemen bilden sich ab einer gewissen NaCl-Konzentration tripelhelicale Komplexe als Zwischenstufe bei der thermischen Umwandlung der doppelhelicalen Komplexe. Im Falle des Poly A · Poly U können die Reaktionen folgendermaßen formuliert werden:



Die höchste erreichbare Temperatur, bei der eine direkte Messung der Umwandlungsenthalpie des Poly A · Poly U möglich ist, beträgt 58°C .

Unter gewissen Annahmen läßt sich jedoch nach dem Heß'schen Satz die Umwandlungsenthalpie des doppelhelicalen Komplexes auch für höhere Umwandlungstemperaturen aus den beiden Umwandlungsenthalpien ΔH_1 und ΔH_2 und der bei niedrigerer

NaCl-Konzentration zu messenden Umwandlungsenthalpie des doppel-helicalen Komplexes berechnen, wobei die letztere Umwandlungs-enthalpie bei der gleichen Umwandlungstemperatur T_1 bestimmt werden muß, bei der bei hoher NaCl-Konzentration der doppel-helicale Komplex gebildet wird. Die Umwandlungsenthalpie kann dann nach dem für die Umwandlung in 0,5 M NaCl-Lösung als Beispiel gegebenen Schema berechnet werden⁷⁸:



Voraussetzung für diese Behandlung der Meßdaten ist, daß die Umwandlungsenthalpien nicht von der NaCl-Konzentration abhängig sind, was durch eine Reihe von Messungen^{86,95} und theoretische Überlegungen⁹⁶ bestätigt wurde und daß die Enthalpieänderung ΔH_4 , die der Addition eines Poly U-Stranges an die Doppelhelix entspricht, zumindest im betrachteten Temperaturintervall als temperaturunabhängig angesehen werden kann. Die letztgenannte Enthalpieänderung ΔH_4 wurde für die drei entsprechenden Messungen (siehe Tab. IV) jeweils berechnet.

Es ergab sich ein Wert von $19 \text{ kJ/mol BP} \pm 0,8 \text{ kJ/mol BP.}$

Die geringe Breite der Streuung dieser Werte, die im experimentellen Fehlerbereich liegt, kann als Bestätigung der obigen Annahmen betrachtet werden. Die Umwandlungsenthalpie ΔH_3 wurde aus der Abb. 35 entnommen. Sie entspricht der Enthalpieänderung des doppelhelicalen Komplexes, die in etwa 50 mM NaCl-Lösung gemessen wird.

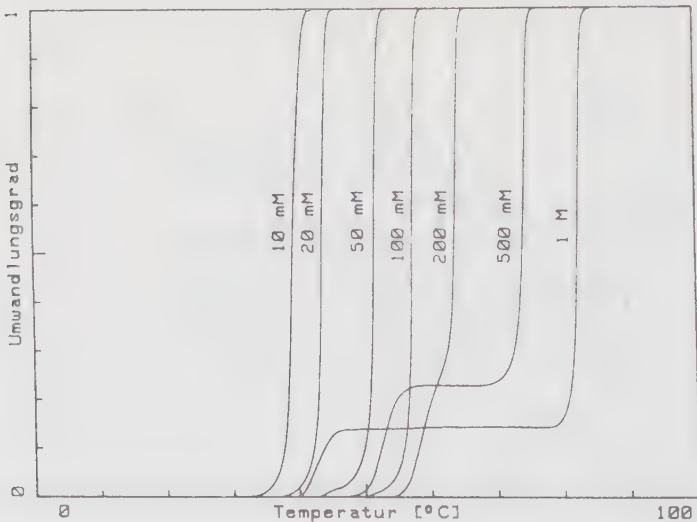


Abb. 34

Der kalorimetrisch bestimmte Umwandlungsgrad des Poly A-Poly U als Funktion der Temperatur. Die NaCl-Konzentration ist angegeben (1 mM Tris, pH 7,5)

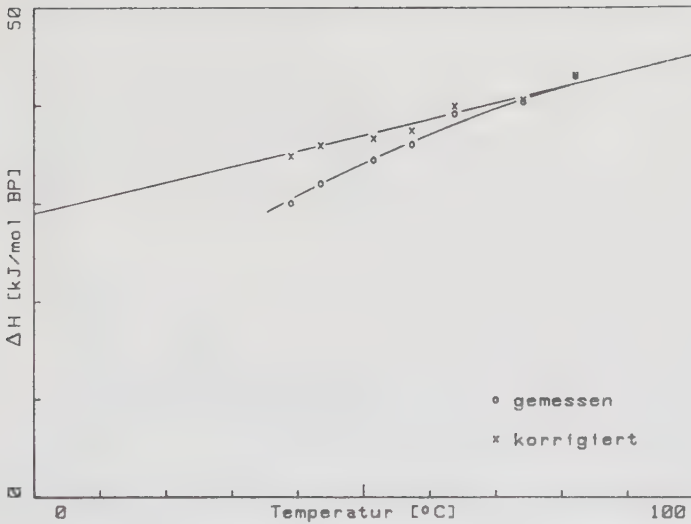


Abb. 35

Auswertung der kalorimetrischen Meßdaten des Poly A · Poly U

Abb. 35 zeigt, daß die Umwandlungsenthalpie des AU-Basenpaares in guter Näherung linear mit der Temperatur steigt, mit einem auf 25°C bezogenen Wert von $\Delta H = 33 \text{ kJ/mol BP}$ und einer Änderung von $d\Delta H/dT_m = 160 \text{ J/mol BP} \cdot ^\circ\text{C}$. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit den von V.V. Filimonov und P.L. Privalov bestimmten Werten von $\Delta H = 34 \text{ kJ/mol BP}$ und $d\Delta H/dT_m = 134 \text{ J/mol BP} \cdot ^\circ\text{C}$, sowie dem von E. Neumann und Th. Ackermann durch Extrapolation auf eine hohe Umwandlungstemperatur erhaltenen Wert von 39 kJ/mol BP . Der von Breslauer et al.¹⁰¹ für das selbstkomplementäre Oligonukleotid

A_7U_7 ist etwas niedriger. In 1 M NaCl-Lösung wurde bei einer Umwandlungstemperatur von 46°C eine Umwandlungsenthalpie von 29,7 kJ/mol BP bestimmt. Diese Abweichung kann damit erklärt werden, daß die Stapelungsenthalpie des freigesetzten Oligonukleotides¹⁰² nicht berücksichtigt wurde und daß bei einer Doppelhelix, die 14 Basenpaare enthält, die Stapelungsenthalpie nur dreizehnmal auftritt.

Die Umwandlungen des Poly (A,G) · Poly U sind sehr viel weniger kooperativ als die des Poly A · Poly U. Die schon aus dem Verlauf der IR-Umwandlungskurven vermutete Tatsache, daß die Umwandlung bei einer NaCl-Konzentration von 1 mol/l über die Zwischenstufe einer Tripelhelix verläuft, wird durch die kalorimetrischen Messungen bestätigt.

Die Umwandlungskurve (Abb. 36) läßt deutlich zwei Peaks erkennen, während die Auftragung des Umwandlungsgrades gegen die Temperatur (Abb. 37) keine Zwischenstufe, sondern nur die bereits aus der Messung der IR-Absorption bei 1659 cm^{-1} bekannte Verbreiterung der Umwandlung erkennen läßt. Bei weiter erhöhten Salzkonzentrationen sind in beiden Darstellungsformen beide Übergänge deutlich zu erkennen.

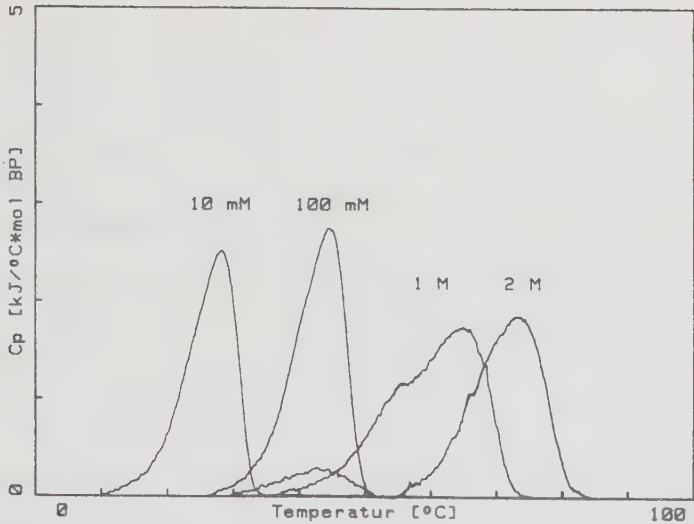


Abb. 36

Normierte kalorimetrische Umwandlungskurven des Poly (A,G)·Poly U.
Die jeweilige NaCl-Konzentration ist angegeben
(1 mM Tris, pH 7,5)

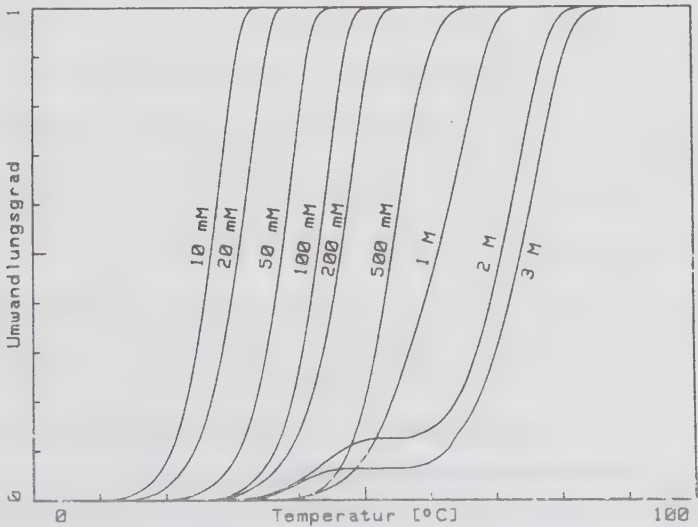


Abb. 37

Der Umwandlungsgrad des Poly (A,G)·Poly U als Funktion
der Temperatur

Die bei einer NaCl-Konzentration von 1 mol/l gemessene Umwandlungsenthalpie wurde nicht nach dem für die Umwandlungen des Poly A · Poly U angegebenen Verfahren bestimmt. Da beide Umwandlungen sich stark überlagern, wurde der Übergang so wie die bei niedrigeren Salzkonzentrationen untersuchten Umwandlungen behandelt und die Gesamtenthalpiedifferenz direkt aus der Fläche der Umwandlungspeaks bestimmt. Die Umwandlungsenthalpien, die bei weiter erhöhten NaCl-Konzentrationen gemessen wurden, können zur Charakterisierung des doppelhelicalen Komplexes nicht verwendet werden. Die Umwandlungen sind von Aggregationen und Ausflocken des Poly (A,G) begleitet, so daß die gemessenen Enthalpiedifferenzen zu niedrig sind.

Die Auswertung der Meßdaten wurde analog ausgeführt wie im Falle des Poly A · Poly U. Die kalorimetrischen Meßdaten für die thermisch induzierte Umwandlung des Poly (A,G) wurden zur Korrektur der gemessenen Umwandlungsenthalpien verwendet.

Die korrigierten Umwandlungsenthalpien lassen sich in guter Näherung durch eine Gerade darstellen, deren Steigung sehr viel geringer ist als die der entsprechenden Gerade für AU-Basenpaare.

Unter der Annahme, daß die Stabilisierungsenthalpie eines Basenpaares nicht von der Art der benachbarten Basen abhängt, was zumindest für DNAs nachgewiesen ist⁸⁸, ergibt sich der in Abb. 38 eingezeichnete lineare Verlauf der auf 1 mol Basenpaar bezogenen Umwandlungsenthalpie des GU-Basenpaares. Die Umwandlungsenthalpie, die für 25°C bestimmt wird, beträgt $\Delta H = 28 \text{ kJ/mol BP}$, die Änderung der Temperatur beträgt $d\Delta H/dT = -130 \text{ J/mol BP} \cdot ^\circ\text{C}$.

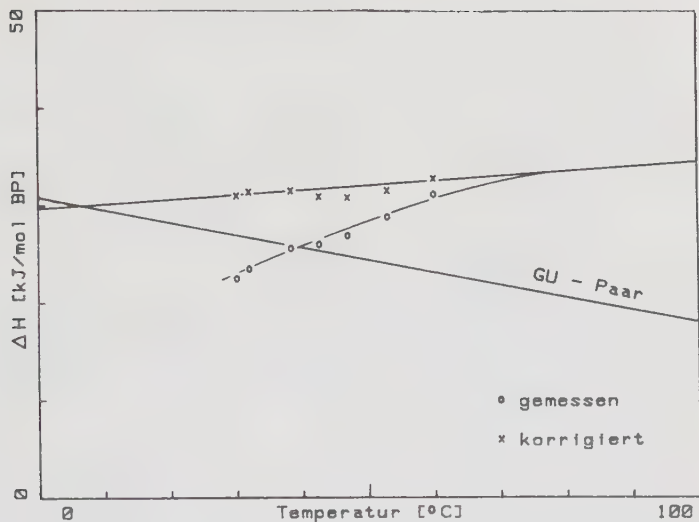


Abb. 38

Auswertung der kalorimetrischen Meßdaten des Poly (A,G)·Poly U

Im Gegensatz zu der für das AU-Basenpaar bestimmten Umwandlungsenthalpie, die linear mit der Temperatur steigt, fällt die Umwandlungsenthalpie des GU-Basenpaares mit der Temperatur.

P.L. Privalov und V.V. Filimonov schätzten die Umwandlungsenthalpie des GU-Basenpaares aus kalorimetrischen Umwandlungskurven einiger t-RNAs ab⁹⁷. Der dabei erhaltene Wert von 30 kJ/mol ist in ausgezeichneter Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit auf direktem Wege erhaltenen Wert.

Die Ergebnisse der kalorimetrischen Messungen sind in Tabelle I zusammengefaßt. Für diejenigen Umwandlungen der doppelhelicalen Komplexe, die ohne Zwischenstufe ablaufen, sind als Vergleich die sich für einen "Alles - oder - Nichts" -Prozeß ergebenden

Tabelle IV: Kalorimetrische Messungen der doppelhelicalen Komplexe

[NaCl]	Poly A • Poly U			Poly (A,G) • Poly U		
	$T_m [^{\circ}\text{C}]$	$\Delta H [\text{kJ/mol BP}]$ gemessen	$\Delta H_{\text{van't Hoff}} [\text{kJ/mol}]$ korri- giert	$T_m [^{\circ}\text{C}]$	$\Delta H [\text{kJ/mol BP}]$ gemessen	$\Delta H_{\text{van't Hoff}} [\text{kJ/mol}]$ korri- giert
10 mM	39	30,1	34,9	39	30,1	31,0
20 mM	43,5	32,1	36,0	50	23,5	31,4
50 mM	51,5	34,5	36,7	69	25,6	31,5
100 mM	57,3	36,1	37,5	77	26,0	30,9
200 mM	58	3,6	39,2	47	26,9	30,8
500 mM	63,2	58,2 ^x	40,0	53	28,8	31,5
	52	8,4	40,4	53	31,1	32,7
	74,2	59,4 ^x	43,0	53	[3,5]	
1 M	42,5	6,0	43,1	53	[49,9 ^x]	
	82,1	62,0		64	[1,7]	
2 M				42	[51,0 ^x]	
3 M				71		
				38,7		
				73,4		

^xUmwandlungsenthalpien der tripelhelicalen Komplexe, auf 1 mol Basentriplett bezogen.

van't Hoff'schen Enthalpien angegeben. Die berechnete mittlere kooperative Länge der helicalen Segmente bei der Umwandlungstemperatur liegt für das Poly (A,G) • Poly U bei etwa 10 Basenpaaren, während sich für das Poly A • Poly U ein Wert von 40 - 80 Basenpaaren ergibt.

3.4.1.5 Zustandsdiagramm und zusammenfassende Beschreibung des Systems Poly (A,G)/Poly U

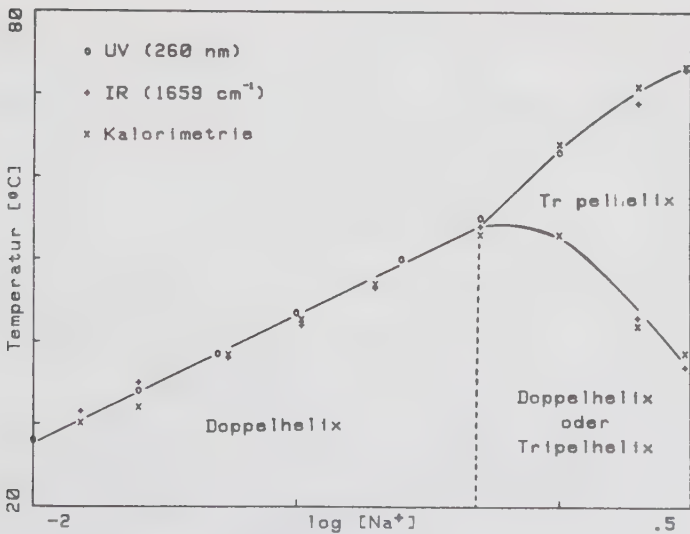


Abb. 39

Abhängigkeit der Umwandlungstemperatur von der Na⁺-Konzentration

Die mit den verschiedenen Methoden erhaltenen Umwandlungstemperaturen sind in Abb.39 als Funktion des $\log [\text{Na}^+]$ dargestellt. Als Na^+ -Konzentration wurde die Summe der Gegenionen der Polynukleotide und der als NaCl zugefügten Na^+ -Ionen verwendet.

Es ergibt sich ein ähnliches Diagramm wie für das bekannte System Poly A/Poly U. Zwei weitgehend lineare Kurvenzüge trennen den Existenzbereich der beiden Komplexe von dem Existenzbereich der statistischen Knäuel. Für den doppelhelicalen Komplex gilt:

$$\frac{d T_m}{d \log [\text{Na}^+]} = 15,4 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Für den tripelhelicalen Komplex gilt:

$$\frac{d T_m}{d \log [\text{Na}^+]} = 30,7 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Diese Werte sind leicht niedriger als die für das System Poly A/Poly U gemessenen Werte von $19,6^\circ\text{C}$ und $36,0^\circ\text{C}$ ⁷⁹, sie sind jedoch von der gleichen Größenordnung.

Das Zustandsdiagramm des Poly (A,G)/Poly U weist aber auch wichtige Unterschiede gegenüber dem des Poly A/Poly U auf. Der Existenzbereich des doppelhelicalen Komplexes ist stark vergrößert, der des tripelhelicalen Komplexes ist verkleinert. Bei niedrigen Salzkonzentrationen wurde keine Kurve gefunden, die dem Übergang einer Tripelhelix in die Doppelhelix entspricht. Erst bei NaCl-Konzentrationen von mindestens $0,5 \text{ mol/l}$

bildet sich auch bei tiefer Temperatur spontan der tripelhelicale Komplex, der unter diesen Bedingungen stabiler ist als der doppelhelicale Komplex. Der doppelhelicale Komplex kann bei hohen NaCl-Konzentrationen nur durch allmähliches Erhöhen der NaCl-Konzentration aus einer Lösung des doppelhelicalen Komplexes bei niedriger NaCl-Konzentration erhalten werden. Eine Lösung des doppelhelicalen Komplexes bei hoher NaCl-Konzentration wandelt sich beim Stehenlassen der Lösung innerhalb mehrerer Tage spontan in den tripelhelicalen Komplex um.

Das Verhalten der Komplexe in Lösung läßt sich durch die Stabilität des gebildeten GU-Basenpaares erklären. Der doppelhelicale Komplex wird stabilisiert, während im tripelhelicalen Komplex keine derartige Möglichkeit zur Stabilisierung existiert. Stattdessen wird die Struktur dieses Komplexes, wie die Messungen an den Oligonukleotidkomplexen in Kapitel 3.3 gezeigt haben, durch die Herausfaltung eines Guanylrestes gegenüber einer vergleichbaren reinen AU_2 -Tripelhelix erheblich gestört.

Die verglichen mit dem AU-Basenpaar geringere Stabilität des GU-Basenpaares wirkt sich in einer deutlichen Erniedrigung der Umwandlungstemperatur des $Poly(A,G) \cdot Poly U$ gegenüber dem $Poly A \cdot Poly U$ um $10^{\circ}C$ bis $15^{\circ}C$ aus. Außerdem ist die Kooperativität der Umwandlung deutlich kleiner. Die mittlere kooperative Länge von etwa 10 Basenpaaren ist aber so groß, daß es nicht als nötig erscheint, eine zusätzliche Verbreiterung des Überganges durch die Heterogenität in der Basenzusammensetzung der kooperativen Einheiten für die Berechnung der van't Hoff'schen Enthalpien anzunehmen.

3.4.2 Der doppelhelicale Komplex Poly G · Poly (C,U)

3.4.2.1 Die Stöchiometrie des Komplexes

Da bei Guanosin- und Cytidinnukleotiden die Bildung einer doppelhelicalen Struktur die Regel ist und tripelhelicale Strukturen nur unter speziellen Bedingungen erhalten werden können³⁸, wird hier lediglich durch eine UV-Mischkurve untersucht, ob sich die Stöchiometrie des Komplexes durch die Komplexbildung mit dem statistisch kopolymeren Poly (C,U), das einen Anteil von 30% U enthält, ändert und ob die Uridylreste an der Basenpaarung teilnehmen.

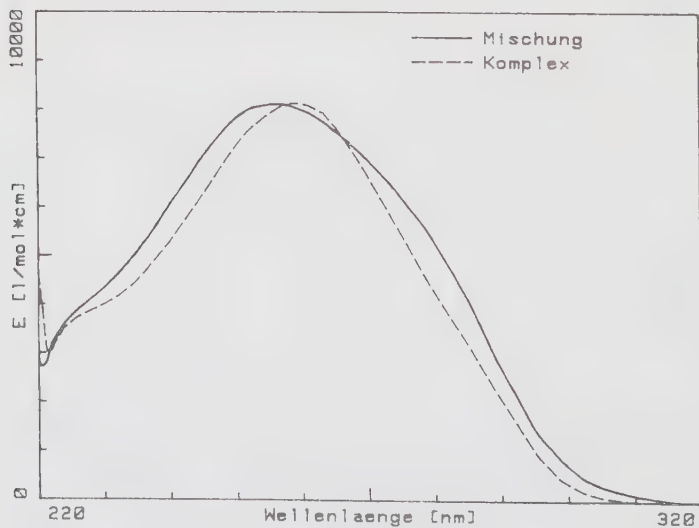


Abb. 40

UV-Spektren des doppelhelicalen Komplexes von Poly G · Poly (C,U) und einer äquimolaren Mischung der Komponenten (7 M Harnstoff, 10 mM Tris, pH 7,5)

Wie Abb. 40 zeigt, ändert sich das Maximum des UV-Spektrums während der Komplexbildung, wie sie in Kapitel 2.2.5 beschrieben wurde, nur sehr wenig. Bei 285 nm, in der Nähe des Absorptionsmaximums des Cytidins beobachtet man einen deutlichen hypochromen Effekt, der geeignet ist, die Komplexbildung zu untersuchen. Der Grund dafür, daß bei dieser Komplexbildung der hypochrome Effekt sehr viel kleiner ist als im Falle der Bildung des Poly A · Poly U oder des Poly (A,G) · Poly U ist darin zu sehen, daß das Poly G selbst schon als Mehrstrang-helix vorliegt⁸⁹⁻⁹¹ und somit kaum mehr zum hypochromen Effekt beitragen kann.

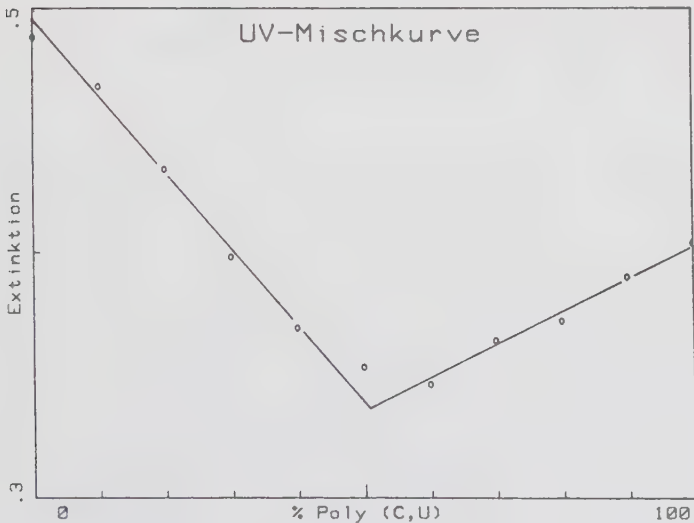


Abb. 41

UV-Mischkurve von Poly G und Poly (C,U)
(7 M Harnstoff, 10 mM Tris, pH 7,5)

Die UV-Mischkurve (Abb. 41) zeigt eine deutliche Knickstelle bei 50% Poly (C,U)-Gehalt. Die Uridylreste sind also in den doppelhelicalen Komplex involviert und werden nicht aus der Doppelhelix herausgefaltet, was eine Knickstelle bei 59% Poly (C,U)-Gehalt zur Folge hätte.

Da die Ergebnisse in diesem Modellnukleotidsystem eindeutig sind, wurde auf die relativ aufwendige Erstellung von IR-Mischkurven verzichtet. Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse über die GU-Wechselwirkung kann man davon ausgehen, daß auch in einer GC-Doppelhelix GU-Basenpaare stabil sind. Dies wird auch durch die folgenden IR- und NMR-Messungen bestätigt.

3.4.2.2 IR-spektroskopische Charakterisierung des Poly G • Poly (C,U)

Das Spektrum des Poly G • Poly (C,U) ist dem des Poly G • Poly C sehr ähnlich. Die Intensitäten der Banden sind nur leicht geändert. Die Carbonylbande, die in Poly G • Poly C bei 1688 cm^{-1} liegt, ist leicht verschoben und befindet sich bei 1690 cm^{-1} . Die zweite Carbonylbande bei 1647 cm^{-1} und die Banden, die den Ringschwingungen entsprechen, nehmen in beiden Spektren fast die gleiche Lage ein. Das ebenfalls eingezeichnete, einem GU-Basenpaar in einer GC-Doppelhelix entsprechende Differenzspektrum, das auf die gleiche Art wie im Falle des Poly (A,G) • Poly U aus den experimentellen Spektren errechnet wurde, weist diese Ähnlichkeit der Bandenlagen ebenfalls auf.

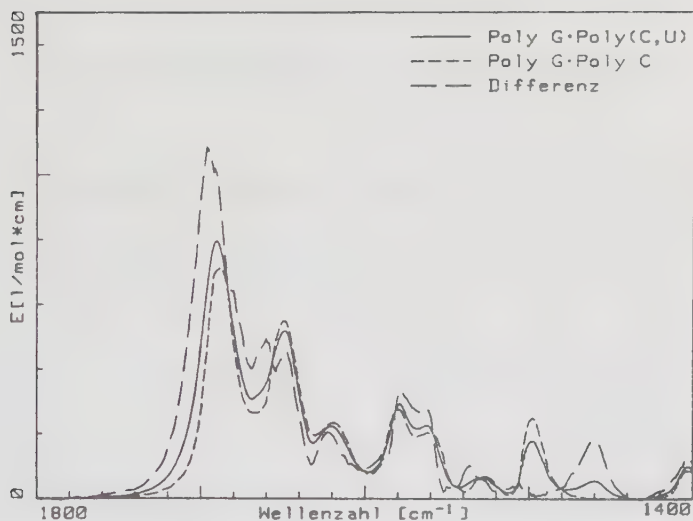


Abb. 42

Vergleich der Spektren von Poly G · Poly (C,U) und Poly G · Poly C (100 mM NaCl, 10 mM Tris, pD 7,5)

Auch in diesem Falle muß darauf hingewiesen werden, daß durch die Differenzbildung eine erhebliche Unsicherheit entsteht. Bei einem angenommenen experimentellen Fehler von 20 l/mol·cm in der Intensität der Spektren der doppelhelicalen Komplexe, der einem relativen Fehler von 5% entspricht, ergibt sich für das Differenzspektrum ein Fehler von etwa 140 l/mol·cm (14%). Bei dieser Betrachtung ist nicht berücksichtigt, daß das Spektrum eines GC-Basenpaares in von vorneherein nicht abschätzbarer Weise durch die Nachbarschaft eines GU-Basenpaares

beeinflusst werden kann und somit nicht mehr in vollem Umfang dem in einer GC-Doppelhelix gemessenen Spektrum entspricht. Da aber dieses Spektrum für die Subtraktion verwendet werden muß, sind bei Auftreten von Nachbarschaftseinflüssen fehlerhafte Subtraktionsergebnisse zu erwarten.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen findet man eine bemerkenswert gute Übereinstimmung der beiden Spektren des GU-Basenpaares, die aus den Spektren des Poly (A,G) • Poly U und des Poly G • Poly (C,U) errechnet wurden. Die beobachteten Abweichungen lassen sich fast vollständig durch den oben diskutierten experimentellen Fehler der Intensitätsbestimmung erklären.

Das Spektrum eines GU-Basenpaares wird nur wenig von der Art benachbarter Basenpaare beeinflusst, und es beeinflusst auch nur in geringem Maße die Spektren benachbarter AU-Basenpaare oder GC-Basenpaare. Auch in diesem System zeigt sich, daß eine Berücksichtigung der nächsten Nachbarn, die bei den meisten anderen spektroskopischen Methoden unerlässlich ist, da die Wechselwirkungen der nächsten Nachbarn den Hauptteil der spektralen Effekte bei der Basenpaarbildung verursachen, im Falle der IR-Spektroskopie doppelhelicaler Strukturbestandteile einer Nukleinsäure nicht erforderlich ist. Die Wechselwirkungen mit den nächsten Nachbarn erzeugen hier nur geringfügige Zusatzeffekte, die zur Erklärung der Spektren im allgemeinen nicht herbeigezogen werden müssen.

Dies wird durch Abb. 43 noch deutlicher demonstriert. Die Spektren von Poly (A,G) • Poly U und von Poly G • Poly (C,U)

sind innerhalb des experimentellen Fehlerbereiches identisch mit den simulierten Spektren, wobei als GU-Referenzspektrum das gemittelte Differenzspektrum aus Abb. 27 und aus Abb. 42 verwendet wurde. Auch für die in den folgenden Kapiteln folgenden Analysen der Spektren ribosomaler RNA wird eine ähnliche Additionsmethode für das Errechnen simulierter Spektren verwendet, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die spektralen Effekte der GU-Basenpaarbildung durch das gezeigte Spektrum gut wiedergegeben werden.

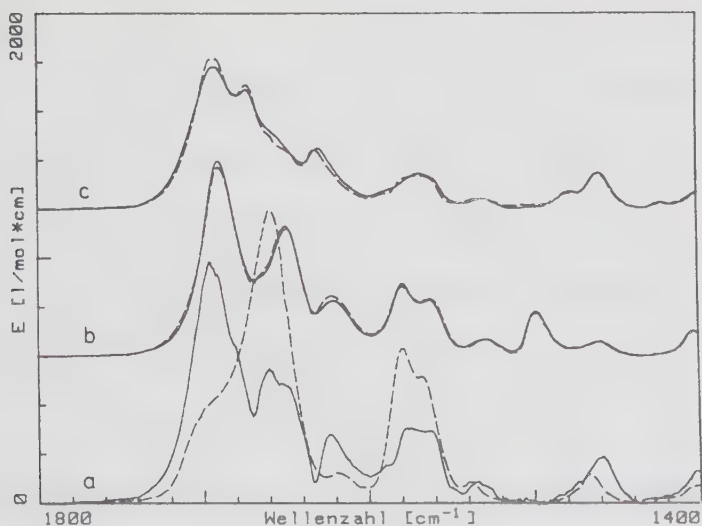


Abb. 43

- a) Das normierte Spektrum des GU-Basenpaares im Vergleich zum simulierten Spektrum aus 50% G und 50% U sowie den Spektren von
- b) Poly G • Poly (C,U) und
- c) Poly (A,G) • Poly U. Die aus den jeweiligen Referenzspektren errechneten simulierten Spektren sind gestrichelt gezeichnet.

Das Spektrum des GU-Basenpaares weist die typischen Eigenschaften auf, die bei einer Basenpaarbildung erwartet werden. Besonders im Carbonylbereich ergeben sich im Vergleich zum simulierten Spektrum drastische spektrale Änderungen. Das simulierte Spektrum enthält die Beiträge der drei Carbonylbanden, die in den freien Nukleotiden beobachtet und interpretiert werden können³⁰, die Carbonylbande des Guanosins bei 1666 cm^{-1} und die beiden Carbonylbanden des Uracils bei 1691 cm^{-1} und bei 1657 cm^{-1} . Diese Banden fallen im simulierten Spektrum weitgehend zusammen und sind nur noch als eine intensive Bande mit einer Schulter zu erkennen. Das Spektrum des GU-Basenpaares enthält zwei deutlich getrennte Carbonylbanden, wobei auch hier das bei Doppelhelixbildung allgemein zu beobachtende Phänomen auftritt, daß die bei hoher Wellenzahl erscheinende Bande intensiver wird und nach etwas höherer Wellenzahl verschoben wird. Sie hat ihr Maximum in der Nähe von 1695 cm^{-1} . Eine weitere Carbonylbande mit geringer Intensität befindet sich in der Nähe von 1655 cm^{-1} . Da mindestens drei Carbonylbanden vorhanden sein müssen, muß eine der beiden Banden durch Superposition zweier IR-Absorptionen zustandekommen. Die Ungenauigkeiten, die mit dem Subtraktionsverfahren verbunden sind, lassen jedoch keine genauere Analyse der Carbonylspektren zu, die beispielsweise die Bandenform zur Festlegung der Lage der verschiedenen Carbonylbanden benutzen könnte.

Die spektralen Veränderungen im Carbonylschwingungsbereich bei der Bildung eines GU-Basenpaares sind ähnlich in ihrer Größenordnung und der Richtung der spektralen Verschiebung wie bei

der Bildung von AU- und GC-Basenpaaren^{68,69}. Sie können somit als qualitativer Hinweis für die Bildung wasserstoffbrücken-gebundener Basenpaare angesehen werden, obwohl eine genaue quantitative Interpretation der Effekte bisher nur teilweise möglich ist^{69,93}.

Von den Banden, die den Gerüstschwingungen der beiden Nukleotide entsprechen, ist wegen der starken Intensitätsänderung bei der Bildung des Basenpaares besonders die des Guanins bei 1577 cm^{-1} mit einer Schulter bei 1565 cm^{-1} zu beachten. Ihre Lage bleibt fast konstant, ihre Intensität wird jedoch etwa um die Hälfte verringert.

Die Untersuchung thermisch induzierter Umwandlungen, die die bei dem doppelhelicalen Komplex Poly (A,G) · Poly U gewonnenen Ergebnisse über Verhalten und Stabilität des GU-Basenpaares unterstützen könnte, ist bei Poly G · Poly (C,U) wegen der hohen Stabilität dieses Komplexes nicht möglich. Die Umwandlungstemperatur liegt über 100°C . Selbst in 8 M Harnstofflösung liegt bei dieser Temperatur ein beträchtlicher Anteil der Polynukleotide noch als Doppelhelix vor.

3.4.2.3 NMR-spektroskopische Messungen an Poly G • Poly (C,U)

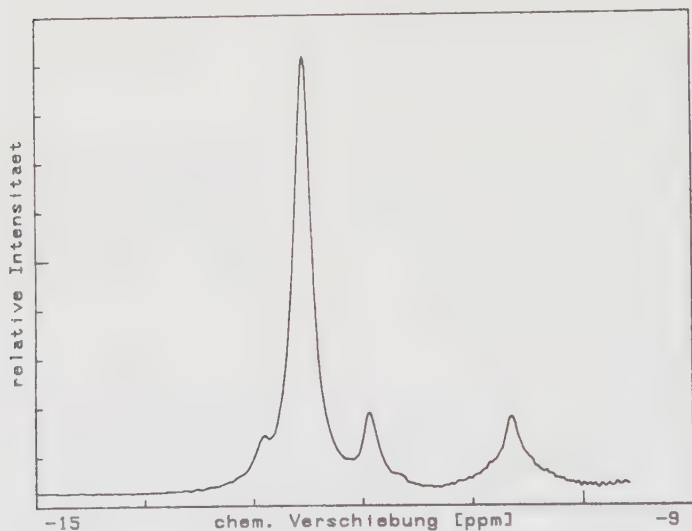


Abb. 44

NMR-Spektrum des Poly G • Poly (C,U)
(Standard:DSS, 65 mg/ml, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris,
pH 7,5 , 41°C)

Abb. 44 zeigt das ^1H - NMR - Spektrum des Poly G • Poly (C,U) mit einem Polymerisationsgrad von 50 - 100. Im dargestellten Bereich des Spektrums findet man die Signale der Ring - N-H - Protonen der Nukleobasen. Nur die Protonen, die in einem Basenpaar in Form einer Wasserstoffbrücke vorliegen, besitzen eine genügend lange Lebensdauer, so daß ihre Signale als Resonanzlinien im Spektrum zu erkennen sind und nicht durch Austauschverbreiterung im Untergrund verschwinden¹⁴. In dem

gezeigten Spektrum sind drei Signale deutlich zu erkennen. Die intensivste Linie bei $-12,6$ ppm muß dem GC-Basenpaar zugeordnet werden. Ihre Lage stimmt mit dem Wert von $-12,7$ ppm sehr gut überein, der nach den Angaben von D.R. Lightfoot et al.¹³⁹ über die Positionen der Signale und deren aufgrund von Ringstromrechnungen zu erwartenden Verschiebungen berechnet wurde. Die beiden schwächeren Linien bei $-11,9$ ppm und $-10,7$ ppm haben ungefähr die gleiche Intensität. Sie sind den beiden Protonen zuzuordnen, die die Wasserstoffbrücken des GU-Basenpaares bilden. Nach den Angaben von H.A.M. Geerdes und C.W. Hilbers¹⁴⁰, die auf Ringstromrechnungen und den experimentellen Spektren von t-RNAs beruhen, können die erwarteten Positionen dieser Resonanzlinien berechnet werden. Für das N_3 -Proton des Uracils in einer GC-Doppelhelix berechnet man eine Lage von $-12,1$ ppm, für das N_1 -Proton des Guanins $-11,3$ ppm.

Die Halbwertsbreite der GU-Signale ist mit 70 Hz etwas größer als die des GC-Signales, die 55 Hz beträgt. Die Intensität der GU-Signale ist jedoch nur etwa halb so groß als die für eine Doppelhelix mit einem GU-Gehalt von 30% erwartete. Offensichtlich beobachtet man nur die Signale der GU-Basenpaare, die auf beiden Seiten der Helix durch benachbarte GC-Basenpaare stabilisiert werden, während die übrigen, die ein GU-Basenpaar als Nachbarn haben, ebenso wie die in Kapitel 3.4.1.3 beschriebenen GU-Basenpaare, die sich in einer AU-Doppelhelix befinden, durch Austauschverbreiterung im Untergrund verschwinden.

3.5 IR-spektroskopische Untersuchungen von 5S RNA und 5.8S RNA in Lösung

3.5.1 Der Einfluß der GU-Basenpaarbildung auf das Spektrum

Die Ähnlichkeit der Spektren von Poly G · Poly C und von Poly G · Poly (C,U) läßt vermuten, daß die spektralen Eigenschaften eines GU-Basenpaares denen des GC-Basenpaares gleichen. Mit Hilfe dieser Vermutung war es möglich, vorgeschlagene Strukturmodelle für 5S RNA aus E.coli zu überprüfen und die dafür errechneten Spektren mit den experimentellen zu vergleichen⁹⁴.

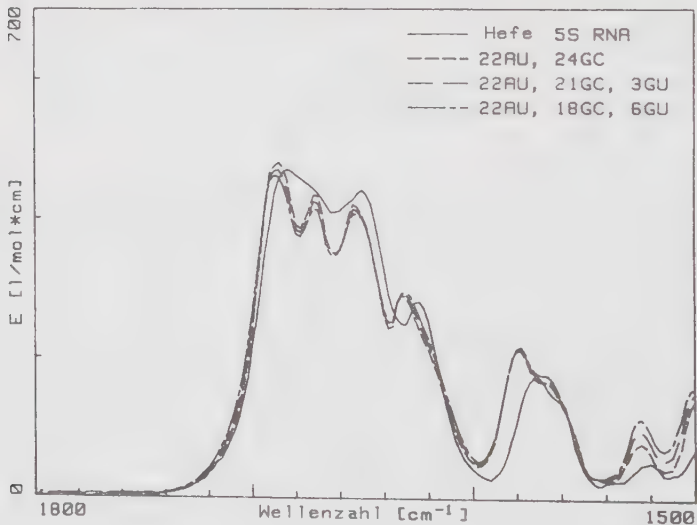


Abb. 45

Vergleich des IR-Spektrums der 5S RNA aus Hefe mit simulierten Spektren. Die Summe von GC- und GU-Basenpaaren ist konstant gehalten.

In Abb. 45 werden die simulierten Spektren verglichen, die man erhält, wenn man schrittweise Anteile, die durch das Spektrum des GC-Basenpaares wiedergegeben werden, durch gleiche Anteile des Spektrums von GU-Basenpaaren ersetzt. Die Unterschiede der simulierten Spektren untereinander sind wesentlich kleiner als die Unterschiede, die sich zum experimentellen Spektrum ergeben.

Die Stelle im Spektrum, die sich am deutlichsten ändert, liegt in der Nähe von 1500 cm^{-1} und entspricht Gerüstschwingungen des Cytidins. Gerade dieser Bereich wird durch die simulierten Spektren jedoch meist nur schlecht wiedergegeben⁹⁴. Er kann durch die hier beginnende Absorption, die durch die HOD-Schwingung in der Nähe von 1460 cm^{-1} verursacht wird, leicht verfälscht werden und zu fehlerhaften Intensitätsmessungen führen.

Man kann also aus dem IR-Spektrum einer Nukleinsäure nicht eindeutig auf die Zahl der GC- bzw. GU-Basenpaare schließen, da man die Einflüsse der Bildung dieser Basenpaare auf das Spektrum nicht mit genügender Genauigkeit voneinander unterscheiden kann. Durch die Analyse der IR-Spektren findet man die Zahl der AU-Basenpaare und die Summe der Zahlen der GC- und GU-Basenpaare.

3.5.2 Die Analyse der IR-Spektren

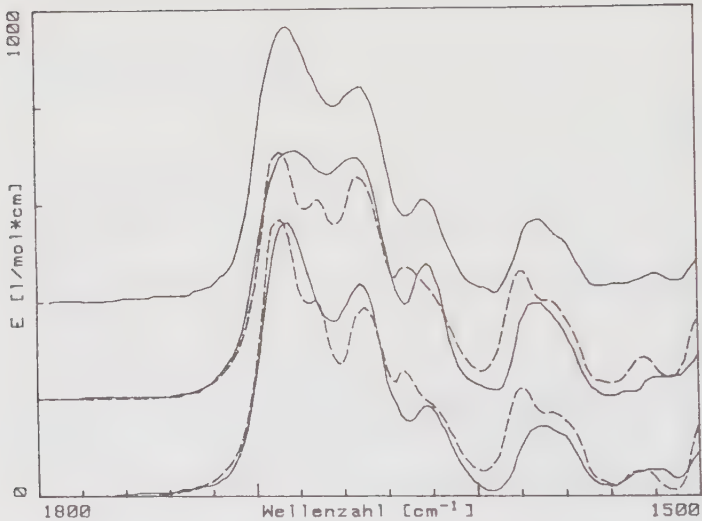


Abb. 46

IR-Spektren der E.coli 5S RNA bei
a) 20°C, b) 52°C und c) nach dem Wiederabkühlen der Lösung
bei 20°C
(20 mM Mg²⁺, 10 mM Tris, pD 7,5) Die simulierten Kurven
sind gestrichelt eingezeichnet.

Abb 46 zeigt die IR-Spektren von Escherichia coli 5S RNA.
Die intakte Sekundär- und Tertiärstruktur des Moleküls wird
durch das bei 20°C gemessene Spektrum wiedergegeben. Es ist
bekannt, daß unter den gewählten Pufferbedingungen E.coli
5S RNA eine zweiphasige thermische Umwandlungskurve besitzt⁹⁸,
wobei die erste Umwandlung bei 52°C beendet ist. Dies wird

bestätigt durch die Aufnahme differentieller UV-Schmelzkurven, die vier getrennte Übergänge erkennen lassen⁹⁹. Auch hier beobachtet man einen ersten Übergang mit einer Umwandlungstemperatur von 35°C, der bei etwa 50°C beendet ist. In Analogie zum Verhalten von t-RNAs bei thermischen Umwandlungen kann erwartet werden, daß während der ersten Umwandlung vorwiegend tertiäre Wechselwirkungen aufgebrochen werden^{97,100}. Deshalb wurde ein zweites IR-Spektrum bei 52°C aufgenommen. Das nach dem Wiederabkühlen der Lösung bei 20°C aufgenommene Spektrum ist fast identisch mit dem zuerst erhaltenen Spektrum. Es zeigt, daß die Nukleinsäure während dieser Behandlung intakt blieb. Kettenbrüche hätten zur Folge, daß zumindest ein Teil der Tertiärstruktur nicht zurückgebildet werden kann.

Für die Ermittlung des Anteils wasserstoffbrückengebundener Nukleotide wurden, wie bereits erwähnt, die Spektren von ApA, UpU, GMP und CpC für die Simulation des Anteils der freien Nukleotide, sowie die Spektren von Poly A • Poly U und Poly G • Poly C für die Simulation des Anteils der wasserstoffbrückengebundenen Nukleotide verwendet. Unter Zugrundelegung der aus der Primärstruktur³ zu entnehmenden Stöchiometrie wurde der Anteil wasserstoffbrückengebundener Nukleotide solange variiert, bis die Übereinstimmung mit dem experimentellen Spektrum am besten wurde. Dieses Verfahren wurde in der Literatur bereits für die Analyse der IR-Spektren mehrerer verschiedener Nukleinsäuren beschrieben^{19,23,24}.

Unter diesen Voraussetzungen findet man bei 20°C für E.coli 5S RNA 20 AU-Basenpaare und 36 GC- bzw. GU-Basenpaare, wobei

in diesen Basenpaarzahlen tertiäre Wechselwirkungen eingeschlossen sind, obwohl sie durch die gewählten Referenzspektren nicht unbedingt richtig wiedergegeben werden. Bei 52°C verringert sich die Zahl der Basenpaare auf 16 AU- und 30 GC- bzw. GU-Basenpaare. In sehr guter Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde mit Hilfe von Temperatursprungmessungen die Zahl der Basenpaare, die während einer ersten Umwandlung im Verlaufe der thermischen Denaturierung getrennt werden, mit einem Wert von etwa 9 abgeschätzt⁹⁹. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß es sich bei dieser Umwandlung wahrscheinlich um das Aufbrechen tertiärer Wechselwirkungen handelt, die nicht unbedingt durch Watson-Crick-Basenpaare beschrieben werden können. Beide Methoden, die hier verglichen werden, verwenden doppelhelicale Strukturen als Referenzzustände, so daß die angegebenen Änderungen der Zahlen wasserstoffbrückengebundener Nukleotide beim Übergang von der Tertiär- zur Sekundärstruktur mit systematischen Fehlern behaftet sein können.

Atomabsorptionsmessungen ergaben, daß, trotz Dialyse gegen Mg^{2+} -freien Puffer, alle Proben mindestens 4 Mg^{2+} -Ionen pro 5S RNA-Molekül enthielten. Bei den für die IR-Spektroskopie verwendeten Konzentrationen bedeutet dies, daß die Messungen bei einer Mg^{2+} -Konzentration von mindestens 20 mmol/l durchgeführt wurden. Eine weitere Erhöhung der Konzentration der Mg^{2+} -Ionen hatte nur einen geringen Einfluß auf die aufgenommenen Spektren.

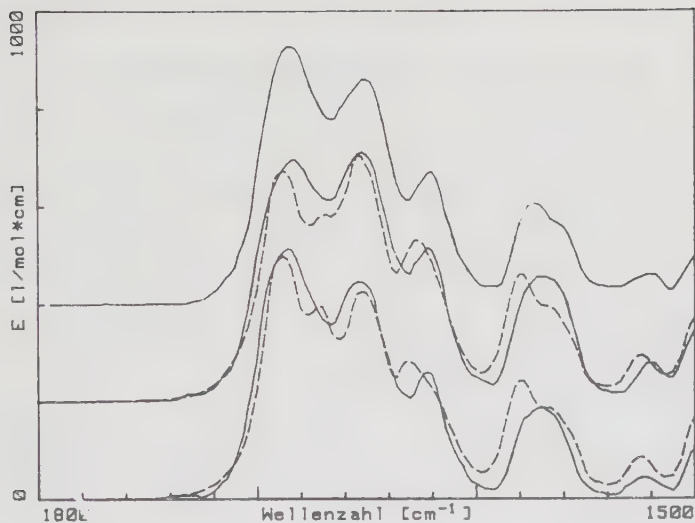


Abb. 47

IR-Spektren der B.stearothermophilus 5S RNA bei a) 20°C, b) 50°C und c) nach dem Wiedersabkühlen der Lösung bei 20°C (20 mM Mg²⁺, 10 mM Tris, pD 7,5)
Die simulierten Kurven sind gestrichelt eingezeichnet.

Als eine weitere prokaryontische 5S RNA, die mit der E.coli 5S RNA verglichen werden sollte, wurde die Bacillus stearothermophilus 5S RNA untersucht. Auch hier wurde angenommen, daß bis 50°C die tertiären Wechselwirkungen weitgehend verschwunden sind, so daß man bei dieser Temperatur ein Spektrum erhält, das weitgehend dem der Sekundärstruktur entspricht.

Die simulierten Kurven entsprechen 17 AU-Basenpaaren und 29 GC- bzw. GU-Basenpaaren bei 20°C und 10 AU-Basenpaaren

und 27 GC- bzw. GU-Basenpaaren bei 50°C. In diesen Zahlen spiegelt sich möglicherweise eine Stabilisierungstendenz der Sekundärstruktur der beiden 5S RNAs wieder. Das wärmeliebende B.stearothermophilus, das bei Umgebungstemperaturen von über 50°C wachsen kann, besitzt eine Sekundärstruktur, die zwar weniger Basenpaare enthält als E.coli 5S RNA, die aber dennoch wegen des hohen Anteils der GC-Basenpaare stabilisiert wird. Bei 50°C beträgt der Anteil der GC-Basenpaare 74% an der Gesamtzahl der gebildeten Basenpaare. Dieser Anteil beträgt für E.coli 5S RNA 65%. Bei der Bildung der Tertiärstruktur verschwindet dieser Unterschied.

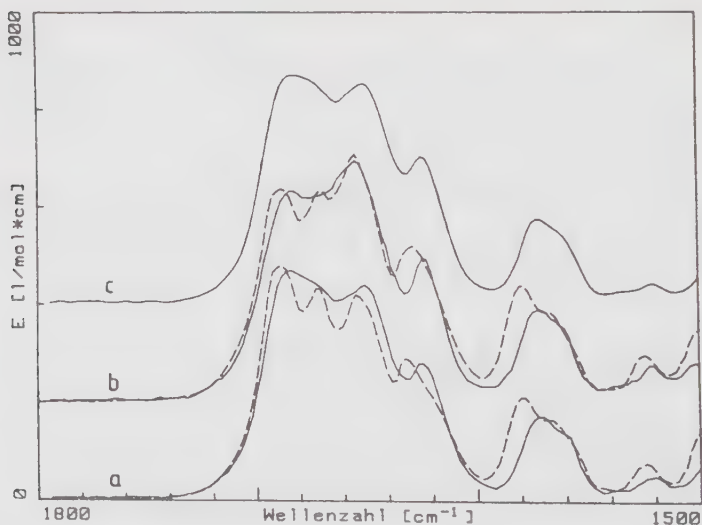


Abb. 48

IR-Spektren von Hefe 5S RNA bei a) 20°C, b) 50°C und c) nach dem Wiederabkühlen der Lösung bei 20°C (20 mM Mg²⁺, 10 mM Tris, pH 7,5). Die simulierten Kurven sind gestrichelt eingezeichnet.

In beiden Molekülen beträgt der Anteil der GC-Basenpaare an der gesamten Sekundär- und Tertiärstruktur etwa 64%.

Als Vertreter der eukaryontischen 5S RNAs wurde die 5S RNA aus Hefe (*Saccharomyces carlsbergiensis*) untersucht. Die hierfür ermittelten Basenpaarzahlen von 27 AU-Basenpaaren und 24 GC- bzw. GU-Basenpaaren bei 20°C und von 16 AU-Basenpaaren und 20 GC- bzw. GU-Basenpaaren bei 52°C sind von den bei den prokaryontischen 5S RNAs ermittelten nicht signifikant verschieden.

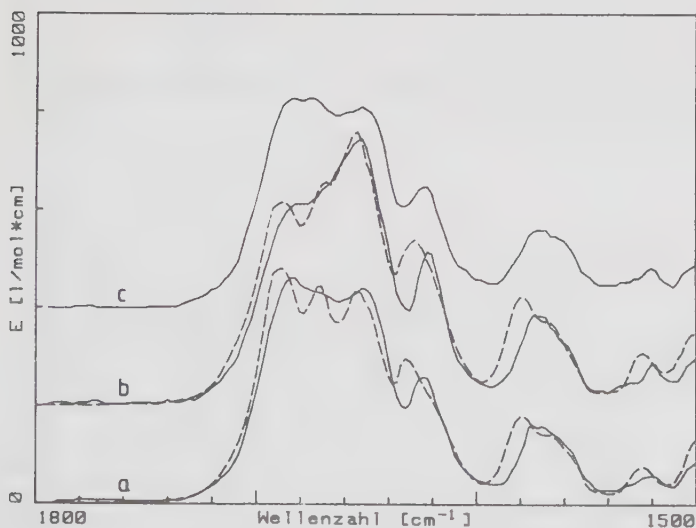


Abb. 49

IR-Spektren von Hefe 5.8S RNA bei a) 20°C, b) 50°C und c) nach dem Wiederabkühlen der Lösung bei 20°C (20 mM Mg^{2+} , 10 mM Tris, pD 7,5). Die simulierten Kurven sind gestrichelt eingezeichnet.

Auch hier besteht wie im Falle der E.coli 5S RNA kein besonderer Zwang zur Stabilisierung der Sekundärstruktur. Der Anteil der GC-Basenpaare an der Sekundärstruktur ist noch etwas geringer als bei dieser RNA und beträgt 53%.

Die 5.8S RNA besitzt bei 20°C ein Spektrum, das 30 AU- und 28 GC- bzw. GU-Basenpaaren entspricht. Diese Zahlen erniedrigen sich bei 50°C auf 20 AU- und 22 GC- bzw. GU-Basenpaare. Die Anteile wasserstoffbrückegebundener Nukleotide sind also auch für diese ribosomale RNA in der gleichen Größenordnung wie die der 5S RNA. Auch hier ist der Anteil der GC-Basenpaare an der Gesamtzahl der in die Sekundärstruktur involvierten Basen mit 52% sehr niedrig.

Die ermittelten Basenpaarzahlen werden zusammenfassend in Tabelle V dargestellt.

Tabelle V: Für die ribosomalen RNAs ermittelte Basenpaarzahlen

RNA	20°C		50°C		% Basenpaarung	
	AU	GC/GU	AU	GC/GU	20°C	50°C
5S RNA <u>E.coli</u>	20	36	16	30	93	77
5S RNA <u>B.stearothermophilus</u>	17	29	10	27	79	63
5S RNA <u>S.carlbergensis</u>	22	25	16	20	76	60
5.8S RNA <u>S.carlbergensis</u>	30	28	20	22	73	51

3.5.3 Vergleich der Ergebnisse mit vorgeschlagenen Strukturmodellen

Für die untersuchten ribosomalen RNAs wurde in der Literatur eine Reihe von Strukturmodellen vorgeschlagen. Für die in Tabelle I aufgeführten Vorschläge wurden die dafür zu erwartenden Spektren errechnet. Die Anteile der Struktur, die auf GU-Basenpaare zurückzuführen sind, wurden dabei in entsprechenden simulierten Spektren durch das in Abb. 43 gezeigte GU-Spektrum wiedergegeben. Zu Vergleichszwecken wurde sowohl das der intakten Struktur entsprechende bei 20°C gemessene Spektrum als auch das hauptsächlich die Sekundärstruktur wiedergebende Spektrum, das bei 50°C aufgenommen wurde, eingezeichnet. Da die meisten Modelle lediglich Wechselwirkungen berücksichtigen, die der Sekundärstruktur zugeordnet werden können, müssen die entsprechenden simulierten Spektren vor allem nach ihrer Übereinstimmung mit dem bei 50°C aufgenommenen Spektrum beurteilt werden.

Der Vergleich der simulierten und der gemessenen Spektren für die 5S RNA aus E.coli (Abb. 50 - 53) zeigt deutlich, daß die für einige Modelle simulierten Spektren mit den experimentell erhaltenen Spektren keinerlei Übereinstimmung zeigen und deshalb höchstens einen Teil der Sekundärstruktur wiedergeben können. Dies gilt beispielsweise für das von Hori und Osawa vorgeschlagene Modell³⁶. Dieses Modell wurde aus dem Vergleich von 54 5S RNA-Primärstrukturen konstruiert, wobei versucht wurde, eine allgemeingültige Sekundärstruktur zu konstruieren.

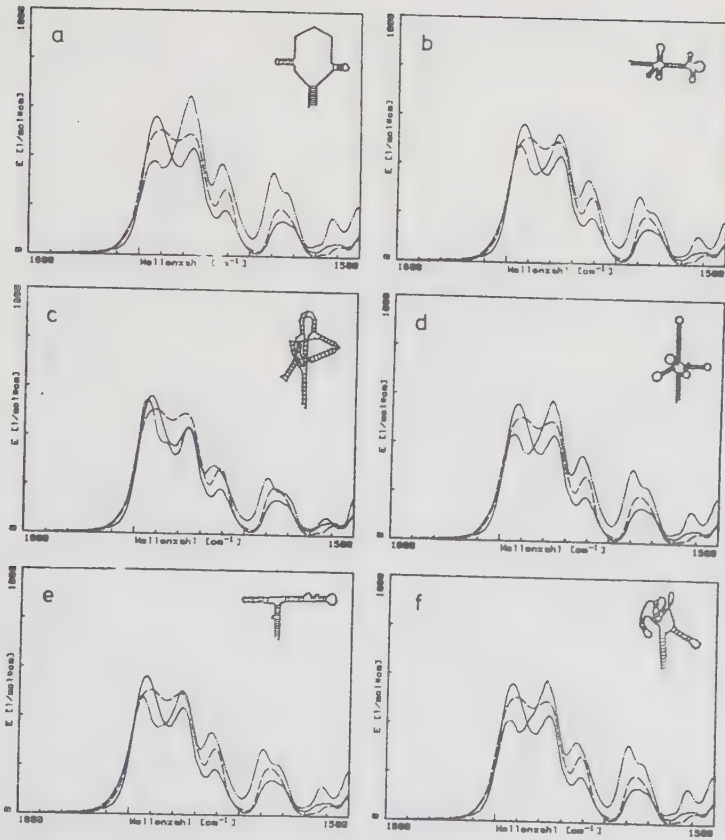


Abb. 50

Vergleich der bei 20°C (—) und der bei 52°C (---) aufgenommenen Spektren von *E. coli* 5S RNA mit den simulierten Spektren (-.-), die für die Strukturmodelle von
a) Brownlee et al.²⁶,
b) Boedtker et al.²⁶,
c) Cantor²⁸,
d) Rasche²⁹,
e) Madison²⁹ und
f) Jordan³⁰ errechnet wurden.

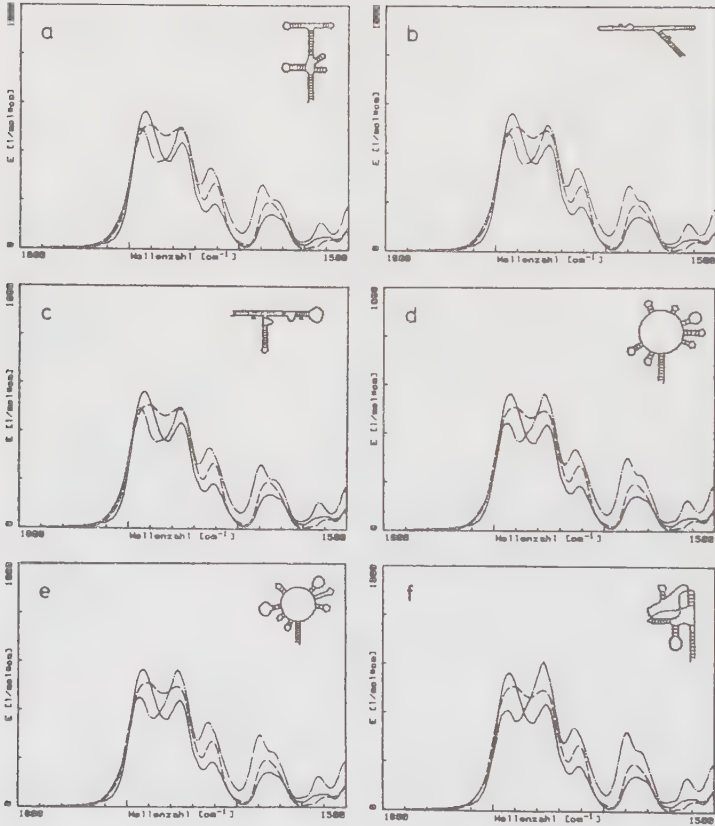


Abb. 51

Vergleich der bei 20°C (—) und der bei 52°C (---) aufgenommenen Spektren von *E. coli* 5S RNA mit den simulierten Spektren (---), die für die Strukturmodelle von
a) und b) Du Buy und Weissmann³¹,
c) - e) Monier³² und
f) Kearns und Wong³³ errechnet wurden.

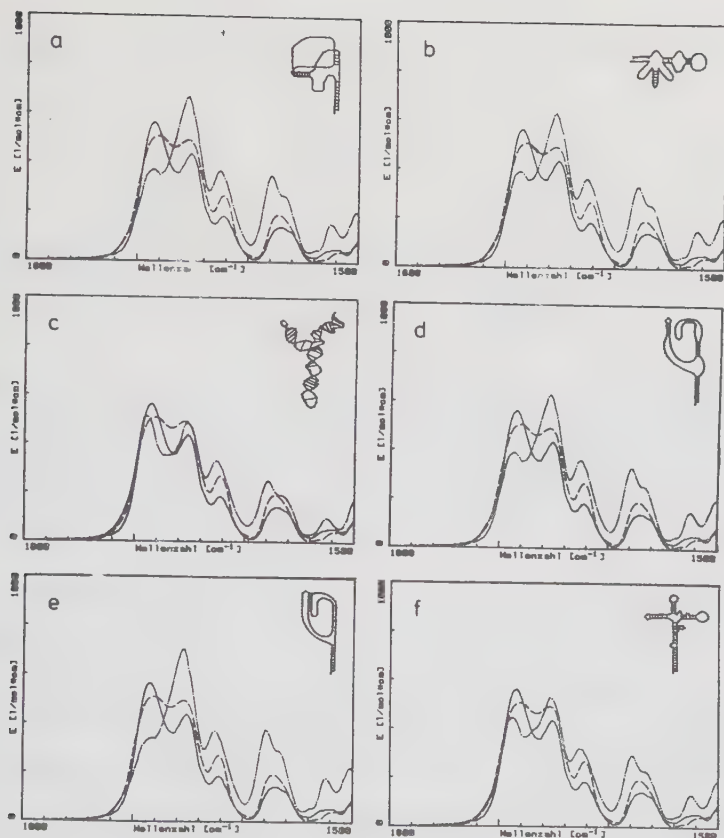


Abb. 52

Vergleich der bei 20°C (—) und der bei 52°C (---) aufgenommenen Spektren von *E. coli* 5S RNA mit den simulierten Spektren (-.-), die für die Strukturmodelle von
a) Kearns und Wong¹¹,
b) Fox und Woese²⁵,
c) Österberg et al.³⁴,
d) und e) Weidner et al.³⁵ und
f) Luoma und Marshall²⁰ errechnet wurden.

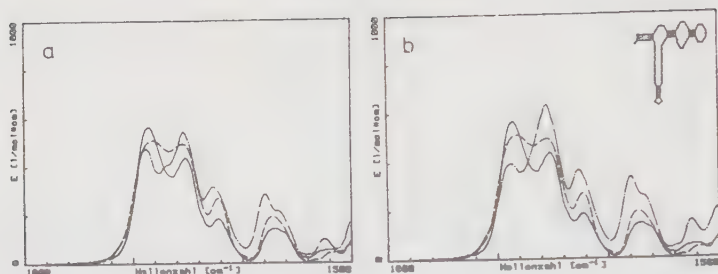


Abb. 53

Vergleich der bei 20°C (—) und der bei 52°C (---) aufgenommenen Spektren von *E. coli* 5S RNA mit den simulierten Spektren (----), die für
a) die aus Raman-spektroskopischen Messungen bestimmten Basenpaarzahlen²² und
b) für das Strukturmodell von Hori und Osawa³⁶ errechnet wurden.

Es kann somit auch nur die Bereiche der Sekundärstruktur richtig beschreiben, die in allen untersuchten 5S RNAs möglich sind. Sekundäre Wechselwirkungen, die für die untersuchte 5S RNA spezifisch sind, und tertiäre Wechselwirkungen können mit einer solchen Methode nicht gefunden werden. Deswegen war die mangelnde Übereinstimmung nicht unerwartet. Ähnliche Überlegungen gelten für die Strukturvorschläge von Fox und Woese³³, Jordan³⁰ und Weidner et al.³⁵. Die zuletzt genannten Autoren wiesen deshalb auch auf die mögliche Existenz einer ausgedehnten Tertiärstruktur hin.

Eine Reihe weiterer Strukturvorschläge, die ebenfalls aufgrund von Plausibilitätsbetrachtungen ohne Verwendung von meßbaren Eigenschaften der RNA zustandekamen, sind mit den gemessenen

IR-Spektren besser zu vereinbaren. Das von Madison²⁹ vorgeschlagene Modell und eines der von DuBuy und Weißmann³¹ vorgeschlagenen Modelle enthalten einen Anteil von gepaarten Nukleotiden, der mit den bei 52°C gemessenen IR-Spektren zu vereinbaren ist. Beim Versuch, ein Modell mit einer maximalen Zahl von Basenpaaren zu konstruieren, postulierte Cantor ein Modell²⁷, das sogar weitgehend mit den bei 20°C aufgenommenen Spektren zu vereinbaren ist und somit als ein plausibles Modell der kompletten Sekundär- und Tertiärstruktur angesehen werden kann, obwohl es im Widerspruch zu den bereits erwähnten vergleichenden Strukturuntersuchungen keine Basenpaarung zwischen den Nukleotiden in den Positionen um 20 und um 60 (vom 5'-Ende aus gezählt) und in den Positionen um 30 und um 50 enthält und deshalb sicherlich kein allgemeingültiges Modell für die räumliche Struktur einer 5S RNA sein kann.

Eine andere Gruppe von Strukturmodellen kam aufgrund von physikalisch-chemischen Eigenschaften zustande, die die 5S RNA in Lösung besitzt. Die beiden Modelle von Kearns und Wong¹¹ wurden aus schlecht aufgelösten NMR-Spektren mit Hilfe einer Integrationsmethode abgeleitet, die auch im Falle von t-RNA^{Phe} zu einer um etwa 30% zu niedrigen Basenpaarzahl führte¹⁴. Erwartungsgemäß zeigen die für diese Modelle simulierten Spektren keinerlei Übereinstimmung mit den experimentellen Spektren. Die aus Raman-spektroskopischen Untersuchungen²⁰ und aus Messungen des Röntgenkleinwinkelstreuung³⁴ gefolgerten Sekundärstrukturmodelle dagegen sind mit den bei 52°C aufgenommenen IR-Spektren zu vereinbaren. Beide enthalten einen

relativ großen Anteil gepaarter Basen, wobei weitere durch tertiäre Wechselwirkungen verursachte Basenpaar-Bildungen möglich sind.

Für B.stearothermophilus 5S RNA liegen wesentlich weniger Strukturvorschläge vor als für E.coli 5S RNA. Da diese Vorschläge im wesentlichen die gleichen sind wie für E.coli 5S RNA, wurde auf eine Simulation ihrer Spektren verzichtet.

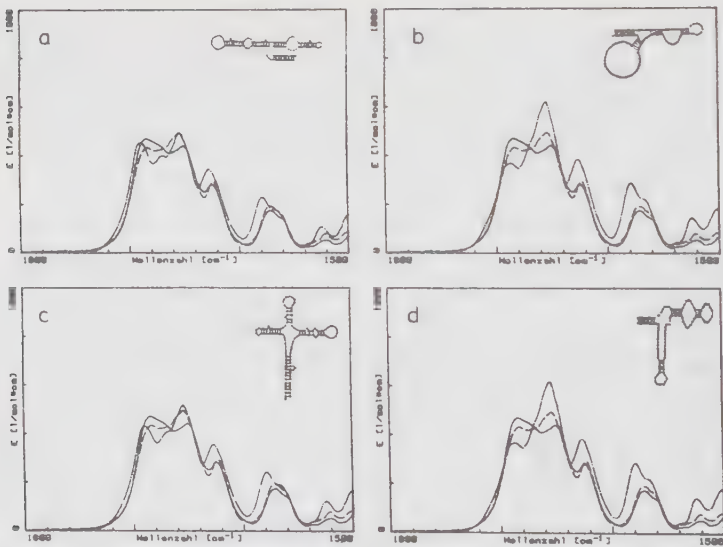


Abb. 54

Vergleich der bei 20°C (—) und der bei 50°C (---) aufgenommenen Spektren von 5S RNA aus Hefe mit den simulierten Spektren (·····), die für die Strukturmodelle von

- a) Nishikawa und Takemura³⁸,
- b) Vigne und Jordan³⁷,
- c) Luoma und Marshall²¹ und
- d) Hori und Osawa³⁶ errechnet wurden.

Auch für die 5S RNA aus Hefe liegen nur wenige Strukturvorschläge vor, von denen zwei ganz deutliche Unterschiede von simulierten und gemessenen Spektren erkennen lassen. Wie auch im Falle der E.coli 5S RNA kann das von Hori und Osawa³⁶ vorgeschlagene Modell höchstens als ein Minimalmodell für die Sekundärstruktur angesehen werden, das nur einen Teil der sekundären Wechselwirkungen, der allen 5S RNAs gemeinsam ist, wiedergibt. Auch das Modell von Vigne und Jordan³⁷ ist mit den IR-Spektren der 5S RNA nicht zu vereinbaren. Die Modelle von Nishikawa und Takemura³⁸ und von Luoma und Marshall²¹ sind weitgehend mit den bei 50°C aufgenommenen Spektren zu vereinbaren, obwohl aus der Intensität der Adenylbanden bei 1630 cm^{-1} geschlossen werden kann, daß die beiden Sekundärstrukturmodelle wahrscheinlich einen zu niedrigen Anteil von AU-Basenpaaren enthalten.

Alle drei überprüften Strukturmodelle für die 5.8S RNA lassen sich mit experimentell erhaltenen IR-Spektren dieser Nukleinsäure vereinbaren. Für das von Luoma und Marshall vorgeschlagene Modell²⁰ erhält man ein IR-Spektrum, das Ähnlichkeiten zu dem bei 20°C aufgenommenen Spektrum aufweist. Das Modell von Rubin³⁹ ist mit dem bei 50°C registrierten Spektrum zu vereinbaren. Das für das Modell von Van et al.⁴⁰ simulierte Spektrum liegt in seinem Verlauf zwischen diesen beiden Spektren. Keines der Strukturmodelle für die 5.8S RNA kann somit aufgrund der IR-spektroskopischen Befunde ausgeschlossen werden.

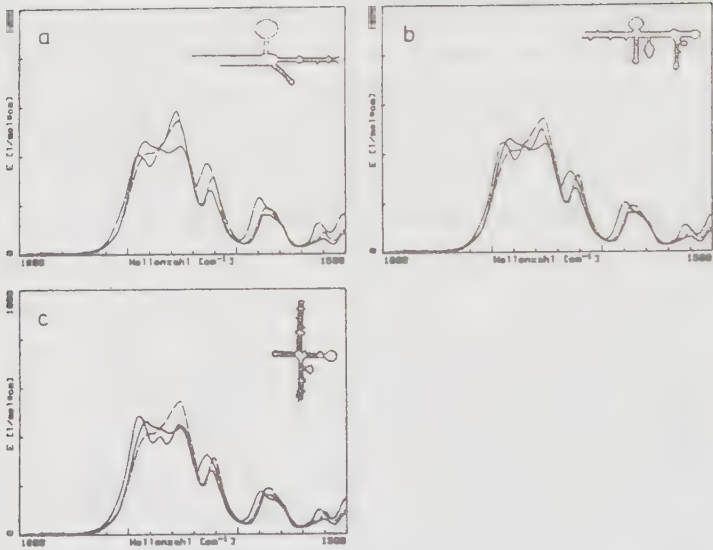


Abb. 55

Vergleich der bei 20°C (—) und der bei 50°C (---) aufgenommenen Spektren von 5.8S RNA aus Hefe mit den simulierten Spektren (-.-), die für die Strukturmodelle von Rubin³⁹, Van et al.⁴⁰ und Luoma und Marshall²⁰ errechnet wurden.

4. Diskussion

4.1 Die tripelhelicalen Komplexe

Die Wechselwirkungen von Oligonukleotiden mit komplementären Polynukleotiden wurden mit einer Vielzahl von verschiedenen Methoden untersucht^{77,84,76,105}. Poly U bildet mit Oligo A tripelhelicale Komplexe, doppelhelicale Komplexe wurden nicht gefunden. Da die Enthalpieänderung bei der Komplexbildung stark von der Kettenlänge der Nukleotide abhängt⁷⁶, kann als Ursache für das unterschiedliche Komplexbildungsverhalten von Polynukleotiden und Oligonukleotiden nur die Entropieänderung des Systems betrachtet werden¹⁰⁶. Bei der hypothetischen Umwandlung des doppelhelicalen Komplexes in den tripelhelicalen werden im Falle des Oligo A sehr viel mehr Teilchen frei als im Falle des Poly A. Dies erklärt zumindest teilweise, warum doppelhelicale Komplexe nicht beobachtet werden können.

Auch wenn sich eine nichtkomplementäre Base am Ende der Oligonukleotidkette befindet, so wird mit Poly U ausschließlich ein tripelhelicaler Komplex gebildet, wobei die nichtkomplementäre Base aus der Helix herausgefaltet wird^{60,73}. Die Art der nichtkomplementären Base hat dabei nur einen geringen Einfluß auf die Umwandlungstemperatur des Komplexes. Die Umwandlungstemperatur des Komplexes von $(Ap)_4X$ mit Poly U, wobei X eine nichtkomplementäre Base bedeutet, liegt um etwa 15°C tiefer als die des Komplexes, der das Oligonukleotid $(Ap)_4A$ enthält. Sie ist nur geringfügig höher als für den Komplex mit $(Ap)_4$, in dem das letzte Nukleosid abgespalten ist und das

damit eine zusätzliche negative Ladung enthält. Wird auch die endständige Phosphatgruppe abgespalten, so steigt die Umwandlungstemperatur um etwa 7°C .

Ähnliche Beobachtungen wurden in der vorliegenden Arbeit bei der Komplexbildung von Poly U mit ApA und mit ApApG gemacht. Der Komplex, den Poly U mit ApGpA bildet, ist noch instabiler als der mit ApApG gebildete Komplex. Dies läßt erwarten, daß mit diesen Oligonukleotiden stabile doppelhelicale Komplexe unter Ausbildung eines GU-Basenpaares gebildet werden können, da, wie im zweiten Teil des dritten Kapitels beschrieben, das GU-Basenpaar mit -28 kJ/mol EP eine Bildungsenthalpie besitzt, die von ähnlicher Größenordnung ist wie die des AU-Basenpaares. Außerdem bietet das GU-Basenpaar im Gegensatz zu dem AU-Basenpaar keine Möglichkeit zur Anlagerung einer weiteren Base in der von Hoogsteen vorgeschlagenen Anordnung¹⁰⁷. Dennoch wurde die Bildung eines doppelhelicalen Komplexes nicht beobachtet. Selbst wenn kein Salz zugefügt wird, bildet sich nach den IR-spektroskopischen Befunden nur der tripelhelicale Komplex. Betrachtet man eine Mischung von 50% Oligonukleotid und 50% Poly U (jeweils bezogen auf die Basenkonzentration), so beträgt die mit Hilfe der kalorimetrischen Meßdaten für Poly A · Poly U und Poly (A,G) · Poly U berechnete Umwandlungsenthalpie für eine Doppelhelix 94 kJ/mol Oligonukleotid. Für die Umwandlung der tripelhelicalen Komplexe wurden Werte von 72 kJ/mol ApApG bzw. von 59 kJ/mol ApGpA bestimmt, wobei berücksichtigt ist, daß 25% der Oligonukleotide unter diesen Bedingungen nicht gebunden vorliegen. Wenn dennoch die Bildung doppelhelicaler Strukturen nicht beobachtet werden

kann, so muß dies auf die unterschiedliche Bildungsentropie der verschiedenen Komplexe zurückgeführt werden. Diese kann aus der Umwandlungsenthalpie der Komplexe ΔH und der Umwandlungstemperatur T_m berechnet werden:

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m}$$

Die so bestimmten Umwandlungsentropien sind in Tabelle VI zusammengefaßt. Als Vergleich wurden auch die Werte für den tripelhelicalen Komplex Poly A + 2 Poly U in die Tabelle mit aufgenommen.

Tabelle VI: Thermodynamische Parameter für die Trennung der tripelhelicalen Komplexe, die mit Poly U in 1 M NaCl-Lösung gebildet werden.

	ΔH [kJ/mol BT]	T_m [°C]	ΔS [J/°C mol BT]	ΔG [kJ/mol BT]
Poly A	62	82	175	9,9
ApA	60	37	193	2,5
ApApG	48	24,5	161	0
ApGpA	39	18,5	134	-0,9

Erwartungsgemäß ist die Umwandlungsentropie des tripelhelicalen Komplexes von ApA mit Poly U größer als die des Poly A $\cdot$ 2 Poly U. Dies kann teilweise durch die unterschiedliche Teilchenzahl, die bei den thermisch induzierten Umwandlungen frei wird, erklärt werden. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß die Umwandlungen der beiden Tripelhelices nicht völlig vergleichbar sind, da die Solvatisierungsmöglichkeiten von ApA und Poly A sicherlich unterschiedlich sind. Bei einer quantitativen Betrachtung der Umwandlungsentropie müßte die Entropieänderung des solvatisierenden Wassers ebenfalls berücksichtigt werden.

Die tripelhelicalen Komplexe des ApApG und des ApGpA mit Poly U weisen eine sehr viel niedrigere Entropieänderung auf als die beiden anderen Komplexe, obwohl auch bei dieser Dissoziationsreaktion die gleiche Zahl von Teilchen aus dem Komplex frei wird wie aus dem Komplex von ApA und Poly U. Auch diese Entropieänderungen können durch nicht quantifizierbare Änderungen der Solvathülle mit beeinflußt werden. Es ist jedoch anzunehmen, daß sich die Änderungen der Solvathüllen von ApA, ApApG und ApGpA nicht stark voneinander unterscheiden, da die Kettenlängen dieser Oligonukleotide ähnlich und wesentlich kleiner als die des als Vergleich dienenden Poly A sind. Der Hauptgrund für die relativ kleinen Werte der Entropiedifferenzen ist demzufolge in einer schon vorhandenen relativen Unordnung dieser beiden tripelhelicalen Komplexe zu sehen, das heißt der aus der Helix herausgefaltete Guanylnrest, dem im Komplex eine gegenüber den gepaarten Nukleotiden erhöhte Bewegungsmöglichkeit zukommt und der die normale Geometrie

einer Tripelhelix erheblich stören kann, muß als Ursache für die relativ kleinen Entropiedifferenzen angesehen werden.

Konsistent mit dieser Erklärung der Entropiedifferenzen sind die gemessenen Enthalpiedifferenzen, die für die Komplexe des Poly U mit ApA und mit Poly A annähernd gleich sind und für die Komplexe mit ApApG und mit ApGpA zunehmend kleiner werden. Auch hier kann man eine zunehmende Störung der Helixgeometrie als Ursache für die gemessenen Effekte ansehen, die dazu führen, daß die Wasserstoffbrückenbindungen oder die Stapelungswechselwirkungen weniger effektiv werden.

Der gleiche Effekt der Störung der Helixgeometrie kann auch die Unterschiede der IR-Spektren der verschiedenen Komplexe erklären. Während die Spektren der Komplexe des Poly U mit Poly A⁷² und mit ApA⁶⁴ im wesentlichen gleich sind und auch weitgehend mit dem in dieser Arbeit gezeigten Spektrum des Komplexes von Poly U mit ApApG übereinstimmen, unterscheidet sich das Spektrum des Komplexes von Poly U mit ApGpA deutlich von den übrigen Spektren.

Obwohl die Ergebnisse, die bei der Untersuchung tripelhelicaler Komplexe gewonnen werden, nicht vollständig auf die für die physikalisch-chemische Untersuchung natürlich vorkommender Nukleinsäuren wichtigen doppelhelicalen Strukturbestandteile übertragen werden können, bieten sie doch eine gute Möglichkeit für Analogieschlüsse. Eine Reihe von Modellvorschlägen für die Sekundärstruktur von 5S RNA, wie zum Beispiel der von Marshall und Luoma²⁰, enthalten mehrere einzelne Basen, die innerhalb einer Doppelhelix ungepaart vorliegen. Die Stabilität

einer solchen Sekundärstruktur wird üblicherweise nach den Regeln von Tinoco et al.¹⁰⁸ abgeschätzt. Da die dafür verwendeten Werte aus optischen Messungen an selbstkomplementären Oligonukleotiden unter der Annahme eines "Alles - oder - Nichts"-Prozesses ermittelt wurden, können sie nur richtig sein, wenn diese Annahme richtig ist. Kalorimetrische Messungen an dem selbstkomplementären Oligonukleotid $(Ap)_7(Up)_6U$ zeigten jedoch, daß die thermisch induzierte Umwandlung durch einen "Alles - oder - Nichts" - Prozeß nicht richtig beschrieben werden kann¹⁰¹.

Der Vergleich der für eine Temperatur von 25°C und eine 1 M NaCl-Lösung berechneten freien Dissoziationsenthalpien für die Komplexe von Poly U mit ApA und mit ApGpA läßt vermuten, daß der von Tinoco et al. für eine einzelne aus einer Doppelhelix herausgefaltete Base angegebene Wert von -12,6 kJ/mol Base zu groß abgeschätzt wurde. In der sehr viel starrereren Tripelhelix, die in dieser Arbeit untersucht wurde, beträgt dieser auf 1 mol Guanylstücke bezogene Wert -6,8 kJ/mol Base.

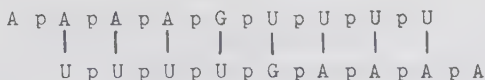
Gensuere Daten, die die energetischen Wechselwirkungen besser beschreiben, könnten mit Hilfe kalorimetrischer Messungen an weiteren selbstkomplementären Oligonukleotiden erhalten werden.

4.2 Die GU-Basenpaarung

Seit das GU-Basenpaar 1966 von F.H.C. Crick vorgeschlagen wurde⁴¹, wurden eine Reihe experimenteller Befunde damit erklärt. Die Ergebnisse kinetischer Untersuchungen von GpGpGpU und GpCpCpC mit Temperatursprungmessungen wurden durch die Ausbildung eines GU-Basenpaares in dem gebildeten Komplex erklärt¹¹⁵.

Die beiden Oligonukleotide AUG und GUG binden an das Anticodon der t-RNA^{fMet} aus E.coli, wobei die beiden Bindungskonstanten gleich sind¹⁰⁹. Hierbei muß berücksichtigt werden, daß im Anticodon einer t-RNA eine spezielle Geometrie durch die Tertiärstruktur dieser Nukleinsäure vorgegeben ist, die die Bindung von Trinukleotiden erleichtern kann und damit auch spezielle Wechselwirkungen, die in einer Doppelhelix nicht vorkommen können, möglicherweise begünstigt.

Die Untersuchung selbstkomplementärer Oligonukleotide und der Vergleich ihrer Umwandlungstemperaturen mit denen von ähnlichen Oligonukleotiden, die in der Mitte eine weitere nichtkomplementäre Base enthalten, ergab, daß nichtkomplementäre Guanylstreste die Doppelhelix weniger destabilisieren als nichtkomplementäre Cytidylreste¹¹⁰. Deswegen ist folgendes Paarungsschema für das untersuchte Oligonukleotid mit einem nichtkomplementären Guanylrest wahrscheinlich:



Die NMR-Spektren einiger t-RNAs, die nach dem Kleeblattmodell GU-Basenpaare enthalten, weisen Resonanzsignale im Bereich zwischen -10 und -12 ppm gegen DSS auf⁴³. Diese Zuordnung wird unterstützt durch die Tatsache, daß auch die Spektren anderer helicaler Nukleinsäuren, die das gleiche Strukturmerkmal eines durch eine Wasserstoffbrücke an eine Carbonylgruppe gebundenen Ring - N-H - Protons aufweisen, wie Poly G⁹⁰, Poly U¹⁰⁴ und Poly d(G-T)⁴⁵, in dem gleichen Spektralbereich eine Resonanzlinie besitzen. Da jedoch die Zahl der GU-Basenpaare nicht immer konsistent ist mit der Intensität in diesem Spektralbereich, wurde die Zuordnung auch bezweifelt¹¹¹. Erst in neuerer Zeit konnte durch Messung des Overhauser-Effektes die Existenz eines wasserstoffbrücken gebundenen GU-Basenpaares in t-RNA^{Phe} aus Hefe direkt nachgewiesen werden¹¹².

Die Versuche, die physikalisch-chemischen Eigenschaften des GU-Basenpaares an geeigneten synthetischen Modellnukleotiden zu untersuchen, waren bisher weitgehend erfolglos. Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt diskutiert, bilden Oligonukleotide mit Poly U keine doppelhelicalen Komplexe. Die Untersuchung der Wechselwirkung von kopolymerem Poly (A,G) mit Poly U führte zu unterschiedlichen und widersprüchlichen Ergebnissen, die teilweise durch die falsche Interpretation von Mischungsexperimenten, bei denen die Extinktion der Proben bei 260 nm gemessen wurde, hervorgerufen wurden⁶⁰. Uhlenbeck et al. schlossen aus der Breite der Umwandlungskurve und aus der Tatsache, daß der untersuchte Komplex von Poly U mit Poly (A,G), das 43% Guanosin enthielt, einen kleineren hypochromen Effekt

zeigt als Poly A·Poly U, daß die Guanylstre aus der Helix herausgefaltet sind⁷³. Formaldehyd, der mit nichtgepaartem Guanin reagiert, griff diese Guanylstre jedoch nicht an. Die gleichen Autoren schlossen aus der Ähnlichkeit der Umwandlungskurven der Komplexe von Poly U mit Poly A und von Poly U mit einem Poly (A,G), das 13% Guanosin enthielt, daß kein GU-Basenpaar gebildet wird, was eine Inkonsistenz in ihrer Schlußweise darstellt. Auch die Untersuchungen von Tsuboi und Akutsu⁷⁵, die die Existenz doppel- und triphelicaler Strukturen im System Poly (A,G)/Poly U nachwiesen, wobei verschiedene Poly (A,G)-Proben mit einem Guanosin-Gehalt von 8 - 30% verwendet wurden, waren nicht geeignet, die GU-Wechselwirkungen nachzuweisen und zu charakterisieren. Das aus diesen Daten konstruierte Zustandsdiagramm für eine der Poly (A,G)-Proben mit Poly U enthält lediglich drei Meßpunkte und ist damit wenig aussagekräftig.

Aus diesen Gründen wurde es in der vorliegenden Arbeit vorgezogen, ein Poly (A,G) mit einem relativ hohen Guanosinanteil auszuwählen, um möglichst deutliche Effekte zu erhalten und den Komplex, den es mit Poly U bildet, mit mehreren physikalisch-chemischen Methoden zu untersuchen. Die Ergebnisse, die mit den verschiedenen Methoden gewonnen wurden, sind konsistent und nur zu erklären, wenn man im Gegensatz zu den oben erwähnten Arbeiten das GU-Basenpaar als einen stabilen, wasserstoffbrücken gebundenen Strukturbestandteil der Doppelhelix betrachtet. Dies wird auch durch den Vergleich der Eigenschaften des GU-Basenpaares bei unterschiedlicher chemischer Umgebung deutlich. Wenn man von den NMR-Messungen

absieht, die eine unterschiedliche Geschwindigkeit des Protonenaustausches mit dem Lösungsmittel erkennen lassen, sind die Eigenschaften des GU-Basenpaares in Poly (A,G) · Poly U und in Poly G · Poly (C,U) gleich. Die IR-Spektren weisen im Carbonylbereich die bei allen bisher untersuchten helicalen Nukleinsäurekomplexen auftretenden charakteristischen Frequenz- und Intensitätsänderungen auf⁸⁰. Die auf 100% GU-Gehalt extrapolierten Spektren gleichen sich innerhalb des Fehlerbereiches; sie können nicht als Summe der entsprechenden Guanosin- und Uridin-Spektren dargestellt werden, was erwartet werden müßte, wenn, wie in den oben zitierten Arbeiten postuliert, keine Basenpaarbildung auftreten würde. Der Vergleich der Spektren und der Mischungsdiagramme zeigt außerdem, daß die GU-Basenpaarbildung weitgehend vollständig verläuft. Diese Schlußfolgerung wird unterstützt durch die von Uhlenbeck et al. beobachtete chemische Resistenz der Guanylreste gegenüber Formaldehyd⁷³.

Kearns et al.⁴⁵ führten NMR-spektroskopische Untersuchungen an alternierenden Poly d(G-T) durch. Diese Messungen bestätigen die bereits früher publizierten Vorstellungen, daß dieses Polynukleotid einen doppelhelicalen Komplex bildet, dessen Basenpaarungsschema analog ist zu dem von Crick vorgeschlagenen Paarungsschema für das GU-Basenpaar⁴⁴. Die Linien der Resonanzsignale für die austauschbaren Protonen sind etwa um einen Faktor 5 breiter als die der nicht austauschbaren Protonen. Dies zeigt, daß selbst bei tiefen Temperaturen eine deutliche Austauschverbreiterung der Signale auftritt, obwohl in diesem Polynukleotid keine Störung der

Geometrie durch verschiedenartige Basenpaare auftreten kann.

In den in dieser Arbeit untersuchten doppelhelicalen Komplexen wird der Austausch der wasserstoffbrückegebundenen Protonen erleichtert durch die leicht unterschiedliche Geometrie der GU-Basenpaare und der benachbarten AU- bzw. GC-Basenpaare. Dies kann als Ursache dafür angesehen werden, daß die NMR-Signale für diese, dem GU-Basenpaar entsprechenden Protonen in dem Komplex Poly (A,G) · Poly U nicht beobachtet werden können. Da auch die AU-Basenpaare durch benachbarte GU-Basenpaare beeinflußt werden, sind auch deren Signale beträchtlich austauschverbreitert.

In Poly G · Poly (C,U) dagegen kann die Hälfte der dem GU-Basenpaar entsprechenden austauschbaren Protonen NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Dies entspricht der Zahl der GU-Basenpaare, die auf beiden Seiten von GC-Basenpaaren umgeben sind. Offensichtlich wird durch den Einbau zwischen zwei sehr stabile Basenpaare der Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel, bei dem eine lokale, kurzzeitige Öffnung der doppelhelicalen Struktur notwendig ist, stark behindert. Sobald mindestens zwei benachbarte GU-Basenpaare vorkommen, sind deren NMR-Signale wegen der nun leichteren Öffnung der Wasserstoffbrücken nicht mehr beobachtbar.

Die kalorimetrischen Messungen an Poly (A,G) · Poly U und ihr Vergleich mit den Messungen an Poly A · Poly U zeigen eine hohe Stabilisierungsenthalpie des GU-Basenpaares. Die Bildungsenthalpie des GU-Basenpaares in einer AU-Doppelhelix, die bei 25°C -28 kJ/mol BP beträgt, ist fast so groß wie der

für das AU-Basenpaar bestimmte Wert von -33 kJ/mol BP. Dies steht im Einklang mit Modellrechnungen, die mit Hilfe der aus Röntgenstrukturanalysen bekannten Moleküldimensionen gewonnen wurden^{42,113}. Wie im Falle des AU-Basenpaares werden zwei Wasserstoffbrücken gebildet; durch eine leichte Änderung der Lage des GU-Basenpaares gegenüber der normalen Geometrie, die in doppelhelicalen RNAs gefunden wird, wird jedoch die Stapelungsenthalpie etwas verringert.

Für die Diskussion der Stabilität des GU-Basenpaares ist jedoch nicht die durch eine kalorimetrische Messung direkt bestimmbare Enthalpieänderung sondern die Änderung der freien Enthalpie zugrunde zu legen. Diese kann aus den kalorimetrischen Meßwerten berechnet werden, da die Enthalpieänderungen nicht von der Konzentration und von zugefügtem NaCl abhängen und durch eine lineare Abhängigkeit von der Temperatur beschrieben werden können⁸⁶.

$$\begin{aligned}
 \frac{d \Delta H}{dT_m} &= \Delta C_p \\
 \Delta H(T) &= \Delta H(T_m) + \int_{T_m}^T \Delta C_p dT \\
 &= \Delta H(T_m) + \Delta C_p \cdot (T - T_m) \\
 \Delta S(T) &= \frac{\Delta H(T_m)}{T_m} + \int_{T_m}^T \frac{\Delta C_p}{T} dT \\
 &= \frac{\Delta H(T_m)}{T_m} + \Delta C_p \cdot \ln \frac{T}{T_m} \\
 \Delta G(T) &= \Delta H(T) - T \cdot \Delta S(T) \\
 &= \Delta H(T_m) \cdot \left[1 - \frac{T}{T_m} \right] + T \cdot \Delta C_p \cdot \left[1 - \frac{T_m}{T} + \ln \frac{T_m}{T} \right]
 \end{aligned}$$

Die thermodynamischen Funktionen ΔH , ΔS und ΔG können also für jede Temperatur berechnet werden, wenn für den betrachteten Komplex die Umwandlungstemperatur T_m , die Enthalpieänderung bei dieser Temperatur $\Delta H(T_m)$ und die Temperaturabhängigkeit der Umwandlungsenthalpie ΔC_p bekannt sind. Es ist zu beachten, daß die Enthalpieänderung unabhängig von der für die Messung verwendeten Salzkonzentration ist. Für die Änderungen der Entropie und der freien Enthalpie dagegen bestehen starke Abhängigkeiten von der verwendeten Salzkonzentration.

Eine Reihe von berechneten Änderungen der freien Enthalpie für die Komplexe Poly A · Poly U und Poly (A,G) · Poly U werden zusammen mit dem daraus bestimmten Anteil, der dem GU-Basenpaar zuzuordnen ist, in Tabelle VII wiedergegeben.

Tabelle VII: Die freie Bildungsenthalpie ΔG [kJ/mol BP] von Poly A · Poly U, Poly (A,G) · Poly U und der daraus bestimmte Anteil des GU-Basenpaares

		10 mM NaCl	100 mM NaCl	1 M NaCl
Poly A · Poly U	0°C	-3,9	-5,8	-7,9
	25°C	-1,4	-3,5	-5,8
Poly (A,G) · Poly U	0°C	-3,0	-4,2	-5,6
	25°C	-0,5	-1,8	-3,3
G · U - Paar	0°C	-1,7	-1,7	-2,0
	25°C	0,9	0,9	0,4

Der Vergleich der Werte in Tabelle VII zeigt, daß bei 25°C ein GU-Basenpaar in einer Poly A · Poly U - Doppelhelix immer leicht destabilisierend wirkt, wobei hier die getrennten Polynukleotidstränge als Referenzzustand betrachtet werden. Tinoco et al.¹⁰⁸ schätzten aus Oligonukleotidbindungsstudien die freie Bildungsenthalpie des GU-Basenpaares unter diesen Bedingungen mit einem Wert von "0" kcal/mol BP ab (1 M NaCl, 25°C). Unter Berücksichtigung der Fehlermöglichkeiten, die mit dieser Abschätzung verbunden sind, kann man die erhaltenen Werte als weitgehend übereinstimmend ansehen. Auch der von den gleichen Autoren angegebene Wert von -1,2 kcal/mol BP (-5 kJ/mol BP) für die freie Bildungsenthalpie eines AU-Basenpaares bei Anlagerung an ein schon gebildetes AU-Basenpaar ist nur wenig kleiner als der in dieser Arbeit erhaltene Wert von -5,8 kJ/mol BP und zeigt, daß für die Diskussion der Stabilität eines Basenpaares die Betrachtung der Wechselwirkung der nächsten Nachbarn genügt. Eine weitergehende Abhängigkeit der energetischen Parameter von der Kettenlänge kann nicht festgestellt werden.

Bei Erniedrigung der Temperatur werden erwartungsgemäß die Stabilitäten des GU- und des AU-Basenpaares erhöht. Für eine Temperatur von 0°C berechnet man eine negative freie Stabilisierungsenthalpie. Während Guanin und Uracil bei einer Temperatur von 25°C also nur infolge kooperativer Wechselwirkungen mit benachbarten stabilen AU-Basenpaaren ein stabiles Basenpaar ausbilden können, wirkt das GU-Basenpaar bei 0°C stabilisierend auf die Doppelhelix.

Die aus den in der Tabelle angegebenen Werten zu berechnenden Entropieänderungen liegen für eine Temperatur von 25°C im Bereich von -90 bis -105 J/°C·mol BP. Die für die beiden Basenpaare ermittelten Werte sind nicht signifikant verschieden voneinander. Sie können als Hinweis dafür betrachtet werden, daß die Geometrie der beiden Basenpaare ähnlich ist.

Die durchgeführte Untersuchung über das GU-Basenpaar lassen erwarten, daß es möglich sein sollte, noch besser geeignete Modellverbindungen mit einem höheren GU-Basenpaaranteil zu erhalten und zu untersuchen. Im Falle des Poly (A,G) · Poly U wird dies limitiert durch die bei steigendem Guaningehalt zunehmende Assoziationsfähigkeit der Guanylstücke, die dazu führt, daß Poly G durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken eine stabile Sekundärstruktur besitzt und selbst mit Poly C nur unter extremen Bedingungen zur Reaktion gebracht werden kann (siehe Kapitel 2.2.5). Eine gut geeignete Modellverbindung, bei der ausschließlich GU-Basenpaare zu erwarten sind, könnte das alternierende Kopolymere Poly (G - U) darstellen. Von diesem Polynukleotid liegen CD-Messungen vor¹¹⁴. Die dafür verwendeten Lösungen enthielten 10 mM NaCl.

Die Messungen ergaben keinerlei Hinweise auf eine Basenstapelung oder eine Basenpaarung. Es ist jedoch zu erwarten, daß bei Verwendung höherer Salzkonzentrationen eine doppelhelicale Struktur unter Ausbildung von GU-Basenpaaren begünstigt wird.

4.3 Die räumliche Struktur der 5S RNA und der 5.8S RNA in Lösung

Sowohl die 5S RNA als auch die 5.8S RNA sind Bestandteile der großen ribosomalen Untereinheit, über die nur relativ wenige Einzelheiten bekannt sind. Ein vollständiges Verständnis ihrer Funktionen ist nur aus der direkten Untersuchung der intakten Ribosomen zu erwarten. Bei einer anderen vergleichbaren Nukleinsäure mit ähnlicher Größe, der t-RNA, treten diese Schwierigkeiten nicht auf. Da sie während eines wesentlichen Abschnitts ihrer biologischen Funktion frei in Lösung vorkommt, muß sie auch in Lösung eine sehr stabile Konformation besitzen, die durch geringfügige Änderungen der Umgebung nicht geändert werden kann. Dies kann als Grund dafür angesehen werden, daß die wesentlichen Teile der Sekundärstruktur schon nach der ersten Sequenzanalyse richtig erkannt wurden¹¹⁶.

Im Gegensatz dazu kommen die 5S RNA und die 5.8S RNA während des Ablaufs ihrer biologischen Funktion niemals frei in Lösung vor. Ein besonderer Zwang, in Lösung eine thermodynamisch sehr stabile Konformation zu erhalten, die auch beim Einbau in das Ribosom erhalten bleibt, besteht deswegen nicht. Die räumliche Struktur der ribosomalen Nukleinsäuren kann durch die Wechselwirkung mit den ribosomalen Proteinen stabilisiert werden. Es wurde sogar angenommen, daß die biologische Funktion der prokaryontischen 5S RNA durch einen Wechsel der Sekundärstruktur ermöglicht wird, in dessen Verlauf sich ein beträchtlicher Anteil der Basenpaare trennt und durch neugebildete ersetzt wird³⁵. So ist es zu verstehen,

daß bisher in der Literatur etwa 30 Vorschläge für die Sekundärstruktur verschiedener 5S RNAs und 5.8S RNAs gemacht wurden, die jedoch die experimentellen Eigenschaften nicht vollständig erklären.

Obwohl ein volles Verständnis der Struktur und Funktion dieser Nukleinsäuren zumindest die Untersuchung der intakten ribosomalen 50S- bzw. 60S-Untereinheiten voraussetzt, wurde diese wegen der experimentellen Schwierigkeiten nur in geringen Ausmaß durchgeführt. Raman-spektroskopische Untersuchungen, die wegen der relativ geringen Intensität der Ramanstreuung der Proteine vor allem Informationen über die Nukleinsäuren vermitteln, wurden so gedeutet, daß eine geringe Änderung der Sekundärstruktur der 16S RNA und der 23S RNA, bzw. der 18S RNA und der 28S RNA bei der Komplexbildung mit den ribosomalen Proteinen auftritt¹¹⁷. Eine genauere Analyse dieser Daten, die einen Nachweis über mögliche Strukturänderungen der um einen Faktor von etwa 30 kleineren 5S RNA ermöglichten, konnte bei diesen Untersuchungen ebensowenig gemacht werden wie bei "Cross - linking" - Experimenten, die zeigen, daß die 16S RNA eine kompakte räumliche Struktur ausbildet, die in der ribosomalen Untereinheit weitgehend erhalten bleibt^{118,119}. Ähnliche Ergebnisse wurden durch die Auswertung von unterschiedlichen Streuexperimenten gewonnen¹²⁰⁻¹²². Danach scheint die RNA in den Ribosomen eine sehr kompakte, hochgeordnete Struktur einzunehmen, an die sich die Proteine anlagern und so die äußere Hülle der Untereinheiten bilden. Aussagen über die 5S RNA und die

5.8S RNA sind auf diese Weise nicht zu gewinnen.

Da man also von den gegenwärtigen Möglichkeiten keine Informationen über strukturelle Einzelheiten dieser kleinen Nukleinsäuren in intakten Ribosomen erwarten kann, ist es unumgänglich, solche Untersuchungen an freien, nichtkomplexierten Nukleinsäuren durchzuführen und anschließend zu überprüfen, in welchem Ausmaß die räumliche Struktur bei der Komplexbildung mit den ribosomalen Proteinen geändert wird. Derartige Untersuchungen liegen bereits vor. Sie sind allerdings teilweise widersprüchlich. Während Messungen der Röntgenkleinwinkelstreuung keine Hinweise auf eine Änderung der Gestalt der 5S RNA aus E.coli bei der Komplexbildung mit den Proteinen L18 und L25 geben^{123,124}, deuten CD-Messungen auf eine geringe Strukturänderung bei der Komplexbildung hin¹²⁵⁻¹²⁷, die aber nicht eindeutig der Sekundärstruktur oder Tertiärstruktur zugeordnet werden kann und möglicherweise auch nur eine Änderung der Basenstapelung anzeigt. Man kann also davon ausgehen, daß die räumliche Struktur der ribosomalen Nukleinsäuren beim Einbau in das Ribosom weitgehend erhalten bleibt, so daß die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse von kleinen Veränderungen abgesehen auch auf die Struktur der 5S RNA und der 5.8S RNA im Ribosom übertragbar sind.

Die IR-spektroskopischen Untersuchungen der 5S RNA und der 5.8S RNA zeigen, daß diese Nukleinsäuren eine ausgedehnte Sekundär- und Tertiärstruktur besitzen. Ähnliche Ergebnisse wurden durch frühere Untersuchungen für die 5S RNAs aus E.coli¹⁸ und aus Hefe¹⁹ gewonnen, wobei die Basenpaarzahlen für die

5S RNA aus E.coli etwas niedriger liegen. Für die 5S RNA aus Hefe konnten keine Angaben über die Basenpaarzahlen gemacht werden.

Der Vergleich der Ergebnisse mit den durch andere Methoden erhaltenen ergibt vor allem mit den Raman-spektroskopischen Daten²⁰⁻²² eine weitgehende Übereinstimmung. Dies läßt sich mit der Ähnlichkeit der Auswertungsverfahren erklären. Bei beiden Methoden wird mit Referenzzuständen für ungeordnete Nukleotide und für in Form von Watson-Crick-Basenpaaren gebundene Nukleotide verglichen. Deshalb wird jede Art von molekularer Ordnung durch diese Verfahren erkannt und kann einen größeren Anteil der Sekundärstruktur vortäuschen als er in Wirklichkeit in der untersuchten Nukleinsäure vorhanden ist. Im Falle der Ramanspektroskopie beispielsweise kann der Ordnungsgrad des Ribose-Phosphat-Rückgrates sowie der Anteil gestapelter Nukleotide bestimmt werden; beides ist jedoch nicht unbedingt mit dem Zustand der Sekundärstruktur gleichzusetzen. Direkte Aussagen über die Zahl der in Form von Watson-Crick-Basenpaaren gebundenen Basen und die Bestimmung von Basen, die über tertiäre Wechselwirkungen gebunden sind und deren Anordnung deshalb von den üblichen Paarungsmustern abweichen kann, sind nicht möglich. Im Falle der IR-Spektroskopie müssen ähnliche Schwierigkeiten beachtet werden. Durch die gewählten Modellsysteme ist gewährleistet, daß die Analyse der Sekundärstruktur umso genauer wird, je länger die ununterbrochenen doppelhelicalen Bereiche des Moleküls sind. Für die t-RNA, die im wesentlichen aus vier helicalen Segmenten besteht, von denen

wiederum jeweils zwei aufeinander stapeln und eine "Doppelhelix" bilden¹⁶, wurden deshalb ausgezeichnete Ergebnisse durch die Analyse der IR-Spektren erhalten^{19,23,24}.

Obwohl Stapelungseffekte nur geringe Einflüsse auf das IR-Spektrum haben¹⁹, unterscheiden sich die Spektren von Poly A · Poly U und von alternierendem Poly (A-U). Diese Unterschiede wurden durch unterschiedliche Koppelungseffekte gestapelter AU-Basenpaare erklärt⁹³. Wenn diese Erklärung über die Koppelung der Schwingungen benachbarter AU-Basenpaare richtig und die einzige mögliche wäre, so müßte man erwarten, daß die Adenylbanden des Poly A · 2 Poly U, des Poly A · Poly U und des bei tiefer Temperatur in Form einer Einstranghelix vorkommenden Poly A wegen der ähnlichen relativen Anordnung der Adenylreste in diesen Nukleotiden die gleiche Lage und Intensität haben. Dies ist jedoch nicht der Fall. Der Extinktionskoeffizient der Adenylbande des Poly A · 2 Poly U bei etwa 1630 cm^{-1} beträgt $300\text{ l/mol}\cdot\text{cm}$ ⁶⁸, der des Poly A · Poly U bei 1631 cm^{-1} beträgt $690\text{ l/mol}\cdot\text{cm}$ (Abb. 16) und der des Poly A bei 1628 cm^{-1} beträgt $1\ 200\text{ l/mol}\cdot\text{cm}$ ⁶⁶ (alle Angaben sind auf 1 mol Adenylreste bezogen). Deswegen ist anzunehmen, daß die Geometrie des alternierenden Poly (A-U) von der in doppelhelicalen RNAs üblichen A-Form abweicht und deswegen zu einem von dem des Poly A · Poly U verschiedenen IR-Spektrum führt. Die IR-Spektren von Poly G · Poly C und von alternierendem Poly (G-C) sind gleich⁶⁶.

Es gibt noch weitere Hinweise dafür, daß das IR-Spektrum

eines Basenpaares nur wenig von der Art benachbarter Basen beeinflusst wird. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die IR-Spektren des GU-Basenpaares in einer AU- und einer GC-Doppelhelix gleich sind. Die Extinktionskoeffizienten der IR-Spektren von DNA-Proben unterschiedlicher Herkunft hängen bei jeder Frequenz linear von dem GC-Gehalt der DNA ab¹²⁸.

Abweichungen von der Linearität und daraus folgende Ungenauigkeiten in den simulierten Spektren sind dann zu erwarten, wenn die oben erläuterten Annahmen nicht zutreffen.

1. Tertiäre Wechselwirkungen können nicht richtig erfaßt werden, da entsprechende Modellspektren fehlen. Tertiäre Wechselwirkungen können durch eine Vielzahl von Basenpaarungen stabilisiert werden, wobei auch von den üblichen Basenpaarungsmustern abweichende Anordnungen gefunden werden¹⁶. Ein Beispiel soll hier stellvertretend erläutert werden. Wenn sich ein Uracil an ein bereits vorhandenes AU-Basenpaar in der Anordnung der AU₂-Tripelhelix anlagert, so wird die Intensität der Adenylschwingung bei etwa 1630 cm^{-1} um die Hälfte verringert. Dies täuscht einen höheren Anteil gepaarter Adenylreste vor, als wirklich vorhanden sind.
2. Wenn eine Struktur gebildet wird, die viele kurze helicale Segmente enthält, so sind die Einflüsse der Helixenden nicht mehr zu vernachlässigen. Diese Enden können anders solvatisiert sein, als Basenpaare, die

sich in der Mitte einer Helix befinden, wodurch das IR-Spektrum beeinflusst werden kann. Damit wurde begründet, daß bei der thermischen Umwandlung des Poly (A,G) · Poly U kein isosbestischer Punkt auftritt (siehe Kapitel 3.4.1.2). Die Größenordnung der durch solche Einflüsse zu erwartenden Abweichungen der simulierten Spektren von den experimentellen zeigt Abb. 56. Das bei 45°C gemessene Spektrum des Poly (A,G) · Poly U, in dem bei dieser Temperatur 50% der Polynukleotide als doppelhelicaler Komplex vorliegen,

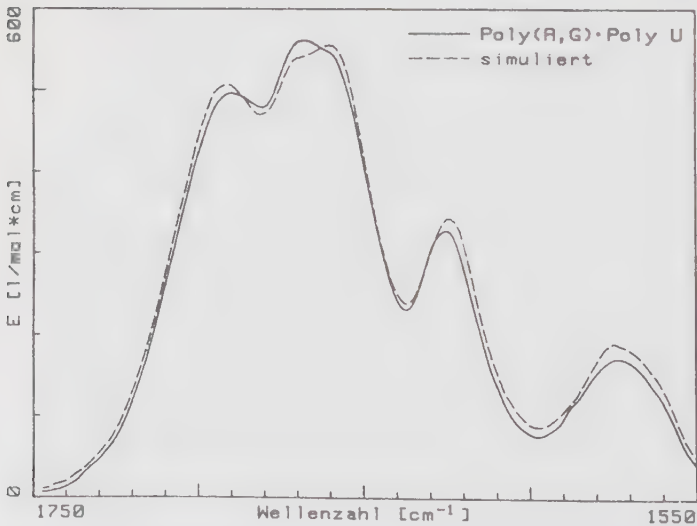


Abb. 56

Vergleich des bei 45°C gemessenen Spektrums des Poly (A,G) · Poly U mit dem simulierten Spektrum (Erläuterungen siehe Text).

kann nicht exakt durch die Summe von 50% des bei 20°C gemessenen Spektrums und 50% des bei 65°C gemessenen Spektrums wiedergegeben werden. In dem gewählten Beispiel entspricht die kooperative Länge 11 Basenpaaren. Bei weiterer Verkürzung der helicalen Segmente sind größere Abweichungen zu erwarten.

3. Auch in einer langen Helix mit zu vernachlässigendem Endgruppeneinfluß können dann Abweichungen von der üblichen Geometrie helicaler Komplexe auftreten, wenn eine große Zahl nichtkomplementärer Basen aus der Helix herausgefaltet wird. Wie durch die IR-spektroskopische Untersuchung der tripelhelicalen Komplexe (siehe Kapitel 3.3.2) gezeigt wurde, führt dies zu Veränderungen des IR-Spektrums. Von den Sekundärstrukturmodellen, die in dieser Arbeit mit den Ergebnissen IR-spektroskopischer Strukturanalysen verglichen wurden, enthalten beispielsweise die von G.A. Luoma und A.G. Marshall vorgeschlagenen^{20,21} eine größere Anzahl von Basen, die aus den jeweiligen Helices herausgefaltet werden.

Diese Einwände gelten prinzipiell für alle Methoden, bei denen Aussagen über den Anteil geordneter Basen durch den Vergleich mit doppelhelicalen Komplexen gewonnen werden. Dennoch liegen bisher keine Untersuchungen vor, die diese Einflüsse genau charakterisieren könnten. Beispielsweise wurde von G.A. Luoma und A.G. Marshall^{20,21} aus Raman-spektren mit einem Signal:Rausch-Verhältnis von etwa 20:1,

deren Grundlinie nicht willkürfrei gewählt werden kann, wie oben erwähnt ein Sekundärstrukturmodell abgeleitet, das eine große Anzahl von Basen enthält, die aus den jeweiligen Helices herausgefaltet werden, ohne die Einflüsse derartig extremer Basenanordnungen oder die Existenzmöglichkeit einer Tertiärstruktur zu diskutieren. In einer neueren Ramanspektroskopischen Untersuchung über die 5S RNA aus Rattenleber¹²⁹, in der diese Probleme ebenfalls nicht diskutiert wurden, wurde dieses Modell als nicht mit den experimentellen Befunden vereinbar betrachtet.

Die Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Methoden gewonnen wurden, sind sehr verschieden voneinander. ^{19}F - NMR - spektroskopische Ergebnisse mit 5S RNA, die anstelle von Uracil 5-Fluoruracil enthielt, ergaben einen Anteil von 65 - 75% in die Sekundärstruktur involvierter Uracilreste¹³⁰. Dieser Anteil wurde durch ^{13}C - NMR - Spektroskopie zu 75 - 95% bestimmt¹³¹. Durch Ramanspektroskopie wurde er zu 35% bestimmt²², während das ebenfalls auf Ramanspektroskopischen Daten beruhende Modell von G.A. Luoma und A.G. Marshall einen Wert von 75% ergibt. In dieser Arbeit wurde ein Wert von 100% ermittelt. Eine kombinierte Raman- und ^{19}F - NMR - spektroskopische Untersuchung ergab ebenfalls einen Wert von 100%¹³². Die ^1H - NMR - spektroskopische Bestimmung der Anzahl der austauschbaren Protonen, die im Falle der t-RNA mit der Zahl der gebildeten Basenpaare gleichgesetzt werden kann¹⁵, ergab 32 Basenpaare für die 5S RNA aus Hefe in Abwesenheit von Mg^{2+} und 35 - 40 Basenpaare in Mg^{2+} -haltiger Lösung¹³³, 33 Basenpaare für

denaturierte 5S RNA aus E.coli¹³⁴ und mindestens 35 Basenpaare bei 40°C für 5S RNA aus Bacillus licheniformis¹³⁵.

Wie in dieser Arbeit am Beispiel des GU-Basenpaares gezeigt wurde, sind die NMR-Signale der austauschbaren Protonen nicht immer zu beobachten, so daß diese Zahlen als untere Grenze für die Zahlen der wirklich vorhandenen Basenpaare angesehen werden müssen. Auch Oligonukleotidbindungsstudien, die anzeigen, daß weite Bereiche der 5S RNA für eine Bindung zugänglich sind^{12,13}, beweisen nicht, daß diese Bereiche nicht basengepaart sind, sondern nur, daß eine möglicherweise an dieser Stelle vorhandene Struktur thermodynamisch instabiler ist, als der entstehende Oligonukleotidkomplex.

Die hier geschilderten Diskrepanzen lassen sich nur deuten, wenn man annimmt, daß die 5S RNA in Lösung eine Sekundärstruktur annimmt, die nicht durch relativ lange helicale Segmente beschrieben werden kann und die auch beträchtliche Unterschiede aufweist zu der Struktur, die die t-RNA in Lösung annimmt, für die die oben genannten Methoden übereinstimmende molekulare Ordnungsparameter ergeben. Alle Methoden deuten auf ein hochgeordnetes Molekül hin, dessen Struktur aber nur durch relativ schwache Wechselwirkungen stabilisiert wird. Helicale Segmente könnten beispielsweise wie im Modell von G.A. Luoma und A.G. Marshall durch einzelne herausgefaltete Basen destabilisiert sein und so einer Bindung von Oligonukleotiden^{12,13} oder einem Nukleaseangriff^{136,137} zugänglich sein. Darüber hinaus

existiert eine ausgedehnte Tertiärstruktur, die durch verschiedene Methoden belegt ist^{98,99,138} und die die in dieser Arbeit gefundenen hohen Basenpaarzahlen erklärt.

5. Zusammenfassung

1. Der Effekt einer nichtkomplementären Base innerhalb einer Helix wurde IR-spektroskopisch charakterisiert. Durch kalorimetrische Vergleichsmessungen konnte ihr thermodynamischer Einfluß auf die Helixstabilität abgeschätzt werden.
2. Die Bildung des GU-"wobble"-Paares wurde IR-spektroskopisch untersucht. Es konnte ein IR-Spektrum angegeben werden, das es gestattet, dieses Basenpaar bei der Simulation der Spektren natürlicher Nukleinsäuren richtig zu erfassen.
3. Die IR-spektroskopische Untersuchung des Verhaltens von Poly (A,G) · Poly U bei der thermischen Umwandlung ergab, daß bei einer kooperativen Länge von 11 Basenpaaren der IR-spektroskopische Einfluß der Endgruppen nicht mehr vernachlässigt werden kann. Dieses Ergebnis ist bei der Untersuchung der Sekundär- und Tertiärstruktur von Nukleinsäuren zu berücksichtigen.
4. Durch die kalorimetrische Untersuchung des Systems Poly (A,G) · Poly U konnte die Bildungsenthalpie des GU-Basenpaares in dieser Doppelhelix bestimmt werden. Die Stabilität des GU-Basenpaares und des AU-Basenpaares, sowie deren Abhängigkeit von der Temperatur und der NaCl-Konzentration konnte thermodynamisch charakterisiert werden.

5. Die NMR-spektroskopische Untersuchung der GU-Basen-paarbildung ergab einen relativ schnellen Protonen-austausch dieses Basenpaares mit dem Lösungsmittel. Die Geschwindigkeit hängt von der Stabilität der benachbarten Basenpaare ab. Wenn zwei AU-Basenpaare oder ein GU-Basenpaar benachbart sind, so findet man eine so starke Austauschverbreiterung, daß die NMR-Signale der wasserstoffbrückengebundenen Pro-tonen nicht mehr beobachtet werden können.
6. Die IR-spektroskopische Untersuchung von drei 5S RNAs und einer 5.8S RNA ergab, daß diese Moleküle einen sehr hohen Ordnungsgrad besitzen. Der Anteil ge-paarter Basen ist höher als in t-RNAs. Der Anteil der Tertiärstruktur wurde abgeschätzt.
7. Durch die Simulation von IR-Spektren aufgrund von Sekundärstrukturmodellen, die in der Literatur vor-geschlagen wurden, und ihren Vergleich mit den experimentell erhaltenen Spektren konnte eine große Anzahl dieser Modelle als nicht oder nur teilweise richtig ausgeschlossen werden. Der Einfluß struk-tureller Besonderheiten auf das IR-Spektrum, wie einzelner aus helicalen Abschnitten herausgefalteter Basen oder sehr kurzer helicaler Segmente, wurde diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Lehninger, A.L. (1975) Biochemie, Verlag Chemie
Weinheim, S. 613 - 631
- 2 Erdmann, V.A. (1976) in "Progress in Nucleic Acid
Research and Molecular Biology" (Ed.: Cohn, W.E.),
Vol. 18, 45 - 90
- 3 Erdmann, V.A. (1981) Nucl. Acid Res. 9, r25 - r42
- 4 Viotti, A., Sala, E., Nucca, R., Soave, C. (1973) in
"Ribosomes and RNA Metabolism" (Ed.: Zelinka, J.
und Balan, J.), House Slovak Acad. Sci.,
Bratislava, Tschechoslowakei, S. 377
- 5 Wrede, P., Erdmann, V.A. (1973) FEBS Letters 33, 315 - 319
- 6 Ofengand, J., Henes, C. (1969) J. Mol. Biol. 244,
6241 - 6252
- 7 Shimuzu, N., Hayashi, H., Miura, K. (1970) J. Biochem. 67,
373 - 378
- 8 Erdmann, V.A., Sprinzl, M., Pongs, O. (1973) Biochem.
Biophys. Res. Commun. 54, 942 - 948
- 9 Wrede, P., Erdmann, V.A. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 74, 2706 - 2709
- 10 Wong, Y.P., Kearns, D.R., Reid, B.R., Shulman, R.G.
(1972) J. Mol. Biol. 72, 741 - 749
- 11 Kearns, D.R., Wong, Y.P. (1974) J. Mol. Biol. 87,
755 - 774
- 12 Wrede, P., Pongs, O., Erdmann, V.A. (1978) J. Mol.
Biol. 120, 83 - 96
- 13 Appel, B. (1979) Dissertation, Berlin
- 14 Wong, Y.P., Kearns, D.R., Reid, B.R., Shulman, R.G.
(1972) J. Mol. Biol. 72, 725 - 740
- 15 Reid, B.R., Robillard, G.T. (1975) Nature 257, 287 - 291

- 16 Holbrook, S.R., Sussman, J.L., Warrant, R.W., Kim, S.-H.
(1978) J. Mol. Biol. 123, 631 - 660
- 17 Uhlenbeck, O.C., Chirikjian, J.G., Fresco, J.R. (1974)
J. Mol. Biol. 89, 495 - 504
- 18 Richards, E.G., Geroch, M.E., Simpkins, H., Lecanidou, R.
(1972) Biopolymers 11, 1031 - 1039
- 19 Tsuboi, M. (1971) in "International Union of Pure and
Applied Chemistry" Suppl. Vol. 7, 145 - 177
- 20 Luoma, G.A., Marshall, A.G. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 75, 4901 - 4905
- 21 Luoma, G.A., Marshall, A.G. (1978) J. Mol. Biol. 125,
95 - 105
- 22 Chen, M.C., Giegé, R., Lord, R.C., Rich, A. (1978)
Biochemistry 17, 3134 - 3138
- 23 Thomas, G.J. (1969) Biopolymers 7, 325 - 334
- 24 Schernau, U., Ackermann, Th. (1977) Biopolymers 16,
1735 - 1745
- 25 Brownlee, G.G., Sanger, F., Barrel, B.G. (1967) Nature 215,
735 - 736
- 26 Boedtker, H., Kelling, D.G. (1967) Biochem. Biophys. Res.
Commun. 29, 758 - 766
- 27 Cantor, C.R. (1967) Nature 216, 513 - 514
- 28 Raacke, J.D. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 31,
529 - 533
- 29 Madison, J.T. (1968) in "Ann. Rev. of Biochem." (Ed.:
Boyer, P.D.) 37, 131 - 148
- 30 Jordan, B.R. (1971) J. theor. Biol. 34, 363 - 378
- 31 DuBuy, B., Weissmann, S.M. (1971) J. Biol. Chem. 246,
747 - 761
- 32 Monier, R. (1974) in "Ribosomes" (Ed.: Nomura, M.,
Tissières, A., Lengyel, P.) Cold Spring Harbor Lab.,
S. 141 - 168

- 33 Fox, G.E., Woese, C.R. (1975) J. Mol. Evol. 6, 61 - 76
- 34 Österberg, R., Sjöberg, B., Garrett, R.A. (1976)
Eur. J. Biochem. 68, 481 - 487
- 35 Weidner, H., Yuan, R., Grothers, D.M. (1977) Nature 266,
193 - 194
- 36 Hori, H., Osawa, S. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 76, 381 - 385
- 37 Vigne, R., Jordan, B.R. (1977) J. Mol. Evol. 10, 77 - 78
- 38 Nishikawa, K., Takemura, S. (1974) FEBS Letters 40,
106 - 109
- 39 Rubin, G.M. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3860 - 3875
- 40 Van, N.T., Nazar, R.N., Sitz, T.O. (1977) Biochemistry 16,
3754 - 3759
- 41 Crick, F.H.C. (1966) J. Mol. Biol. 19, 548 - 555
- 42 Alden, C.J., Arnott, S. (1973) Biochem. Biophys. Res.
Commun. 53, 806 - 811
- 43 Reid, B.R., Ribeiro, N.S., Gould, G., Robillard, G.,
Hilbers, C.W., Shulman, R.G. (1975) Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 72, 2049 - 2053
- 44 Lezius, A.G., Domin, E. (1973) Nature New Biol. 244,
169 - 170
- 45 Early, T.A., Ohnstedt, J., Kearns, D.R., Lezius, A.G.
(1978) Nucl. Acid Res. 5, 1955 - 1970
- 46 Mohr, S.C., Thach, R.E. (1969) J. Biol. Chem. 244,
6566 - 6576
- 47 Thach, R.E., Doty, P. (1965) Science 147, 1310 - 1311
- 48 Thach, R.E., Doty, P. (1965) Science 148, 632 - 634
- 49 Schetters, H., Gassen, H.G., Matthaei, H. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 272, 549 - 559
- 50 Tomlinson, R.V., Tener, G.M. (1963) Biochemistry 2,
697 - 702

- 51 Fresco, J., Massoulié, J. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85,
1362 - 1353
- 52 Howard, F.B., Frazier, J., Miles, H.T. (1977) Biopolymers 16,
791 - 809
- 53 Englander, J.J., Kallenbach, N.R., Englander, S.W. (1972)
J. Mol. Biol. 63, 153 - 169
- 54 Massoulié, J. (1968) Eur. J. Biochem. 3, 428 - 438
- 55 Wyatt, G.R. (1951) Biochem. J. 48, 584 - 590
- 56 Job, P. (1928) Ann. Chim. 9, 113 - 203
- 57 Cantor, C.R., Schimmel, P.R. (1980) Biophysical Chemistry,
Part III, Verlag Freeman and Company, San Francisco,
S. 1135 - 1139
- 58 Blake, R.D., Massoulié, J., Fresco, J.R. (1967) J. Mol.
Biol. 30, 291 - 305
- 59 Massoulié, J., Blake, R.D., Klotz, L.C., Fresco, J.R. (1964)
C. R. Acad. Sci. Paris 259, 3104 - 3107
- 60 Bautz, E.K.F., Bautz, A.A. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 52, 1476 - 1481
- 61 Messner, G. (1979) Diplomarbeit, Universität Freiburg
- 62 Schernau, U. (1975) Dissertation, Universität Freiburg
- 63 Privalov, P.L., Plotnikov, V.V., Filimonov, V.V. (1975)
J. Chem. Thermodyn. 7, 41 - 47
- 64 Schernau, U., Marcinowski, S., Ackermann, Th. (1979)
Z. f. Physik. Ch. N.F. 117, 11 - 18
- 65 Miles, H.T., Frazier, J. (1964) Biochem. Biophys. Res.
Commun. 14, 21 - 28
- 66 Stulz, J. (1977) Diplomarbeit, Universität Freiburg
- 67 Watson, J.D., Crick, F.H.C. (1953) Nature 171, 737 - 739
- 68 Miles, H.T. (1961) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47, 791 - 796
- 69 Howard, F.B., Frazier, J., Miles, H.T. (1969) Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 64, 451 - 458

- 70 Miles, H.T., Frazier, J. (1964) Biochim. Biophys. Acta 79,
216 - 220
- 71 Miles, H.T., Frazier, J. (1972) Biochem. Biophys. Res.
Commun. 49, 199 - 204
- 72 Miles, H.T. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 1104 - 1109
- 73 Uhlenbeck, O., Harrison, R., Doty, P. (1968) in "Molecular
Associations in Biology" (Ed.: Pullman, B.), Academic
Press, New York, S. 107 - 114
- 74 Lomant, A.J., Fresco, J.R. (1973) Biopolymers 12, 1889 - 1903
- 75 Akutsu, H., Tsuboi, M. (1970) Bull. Chem. Soc. Jap. 43,
3391 - 3399
- 76 Frank, F. (1973) Dissertation, Universität Freiburg
- 77 Shimanouchi, T., Tsuboi, M., Kyogoku, Y., Watanabe, I. (1960)
Biochim. Biophys. Acta 45, 195 - 196
- 78 Neumann, E., Ackermann, Th. (1968) J. phys. Chem. 72,
2170 - 2178
- 79 Krakauer, H., Sturtevant, J.M. (1968) Biopolymers 6,
491 - 512
- 80 Tsuboi, M., Takahashi, S., Harada, I. (1973) in "Phsico-
chemical Properties of Nucleic Acids", (Ed.:
Duchesne, J.), Vol. II, Academic Press, New York,
S. 91 - 145
- 81 Miles, H.T., Frazier, J. (1964) Biochem. Biophys. Res.
Commun. 14, 129 - 136
- 82 Engel, J., Schwarz, G. (1970) Angew. Chem. 82, 468 - 479
- 83 Rawitscher, M.A., Ross, P.D., Sturtevant, J.M. (1963)
J. Am. Chem. Soc. 85, 1915 - 1918
- 84 Baba, Y., Tanaka, S., Kagemoto, A. (1977) Makromol. Chem.
178, 2117 - 2124
- 85 Klump, H. (1972) Biopolymers 11, 2331 - 2336
- 86 Filimonov, V.V., Privalov, P.L. (1978) J. Mol. Biol. 122,
465 - 470

- 87 Leng, M., Felsenfeld, G. (1966) J. Mol. Biol. 15,
455 - 466
- 88 Klump, H., Ackermann, Th. (1971) Biopolymers 10, 513 - 522
- 89 Hattori, M., Frazier, J., Miles, H.T. (1976) Biopolymers
15, 523 - 531
- 90 Yamada, A., Akasaka, K., Hatano, H. (1978) Biopolymers
17, 749 - 757
- 91 Howard, F.B., Frazier, J., Miles, H.T. (1977) Bio-
polymers 16, 791 - 809
- 92 Arnott, S., Chandrasekaran, R., Marttila, C.M. (1974)
Biochem. J. 141, 537 - 543
- 93 Morikawa, K., Tsuboi, M., Takahashi, S., Kyogoku, Y.,
Mitsui, Y., Iitaka, Y., Thomas, G.J. (1973)
Biopolymers 12, 799 - 816
- 94 Appel, B., Erdmann, V.A., Stulz, J., Ackermann, Th.
(1979) Nucl. Acids Res. 7, 1043 - 1057
- 95 Privalov, P.L., Ptitsyn, O. (1969) Biopolymers 8,
559 - 568
- 96 Manning, J. (1972) Biopolymers 11, 937 - 949
- 97 Privalov, P.L., Filimonov, V.V. (1978) J. Mol. Biol.
122, 447 - 464
- 98 Cramer, F., Erdmann, V.A. (1968) Nature 218, 92 - 93
- 99 Kao, T.H., Crothers, D.M. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 77, 3360 - 3364
- 100 Coutts, S.M., Riesner, D., Römer, R., Rabl, C.R., Maaß, G.
(1975) Biophys. Chem. 3, 275 - 289
- 101 Breslauer, K.J., Sturtevant, J.M., Tinoco, I. (1976)
J. Mol. Biol. 99, 549 - 564
- 102 Breslauer, K.J., Sturtevant, J.M. (1977) Biophys.
Chem. 7, 205 - 209
- 103 Heller, M.J., Tu, A.T., Maciel, G.E. (1974) Biochemistry
13, 1623 - 1631

- 104 Young, P.R., Kallenbach, N.R. (1978) J. Mol. Biol. 126,
467 - 479
- 105 Felsenfeld, G., Miles, H.T. (1967) Ann. Rev. Biochem. 36,
407 - 448
- 106 Bloomfield, V.A., Crothers, D.M., Tinoco, I. (1974)
Physical chemistry of nucleic acids, Verlag Harper
and Row, New York, S. 339 - 342
- 107 Hoogsteen, K. (1959) Acta Cryst. 12, 822 - 823
- 108 Tinoco, I., Borer, Ph.N., Dengler, B., Levine, M.D.,
Uhlenbeck, O.C., Crothers, D.M., Gralla, J. (1973)
Nature New Biol. 246, 40 - 41
- 109 Uhlenbeck, O.C., Baller, J., Doty, P. (1970) Nature 225,
508 - 510
- 110 Uhlenbeck, O.C., Martin, F.H., Doty, P. (1971) J. Mol.
Biol. 57, 217 - 229
- 111 Kearns, D.R. (1976) Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol. 18,
91 - 149
- 112 Johnston, P.D., Redfield, A.G. (1978) Nucl. Acids Res. 5,
3913 - 3927
- 113 Arnott, S. (1971) Progr. Biophys. and Mol. Biol. 22,
181 - 213
- 114 Gray, D.M., Tinoco, I., Chamberlin, M.J. (1972) Bio-
polymers 11, 1235 - 1258
- 115 Podder, S.K. (1971) Nature New Biol. 232, 115 - 116
- 116 Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T.,
Marquisee, M., Merrill, S.H., Penswick, J.R.,
Zamir, A. (1965) Science 147, 1462 - 1465
- 117 Thomas, G.J., Prescott, B., Hamilton, M.G. (1980)
Biochemistry 19, 3604 - 3613
- 118 Zwieb, Ch., Brimacombe, R. (1980) Nucl. Acids Res. 8,
2397 - 2411
- 119 Cantor, C.R., Wollenzien, P.L., Hearst, J.E. (1980)
Nucl. Acids Res. 8, 1855 - 1872

- 120 Serdyuk, I.N., Grenader, A.K. (1977) Eur. J. Biochem. 79,
495 - 504
- 121 Serdyuk, I.N., Grenader, A.K., Koteliansky, V.E. (1977)
Eur. J. Biochem. 79, 505 - 510
- 122 Venable, J.H., Spencer, M., Ward, E. (1970) Biochim.
Biophys. Acta 209, 493 - 500
- 123 Österberg, R., Garrett, R.A. (1977) Eur. J. Biochem. 79,
67 - 72
- 124 Österberg, R. (1979) Eur. J. Biochem. 97, 463 - 469
- 125 Nazar, R.N., Willick, G.E., Matheson, A.T. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 1506 - 1512
- 126 Spierer, P., Bogdanov, A.A., Zimmermann, R.A. (1978)
Biochemistry 17, 5394 - 5398
- 127 Willick, G.E., Nazar, R.N., Van, N.T. (1980)
Biochemistry 19, 2738 - 2742
- 128 Nishimura, Y., Morikawa, K., Tsuboi, M. (1973) Bull.
Chem. Soc. Jap. 46, 3891 - 3892
- 129 Fabian, H., Böhm, S., Welfle, H., Reich, P., Bielka, H.
(1981) FEBS Letters 123, 19 - 21
- 130 Marshall, A.G., Smith, J.L. (1977) J. Am. Chem. Soc. 99,
635 - 636
- 131 Hamill, W.D., Grant, D.M., Cooper, R.B., Harmon, S.A.
(1978) J. Am. Chem. Soc. 100, 633 - 635
- 132 Marshall, A.G., Smith, J.L. (1980) Biochemistry 19,
5955 - 5959
- 133 Luoma, G.A., Burns, P.D., Bruce, R.E., Marshall, A.G.
(1980) Biochemistry 19, 5456 - 5462
- 134 Burns, P.D., Luoma, G.A., Marshall, A.G. (1980) Biochem.
Biophys. Res. Commun. 96, 805 - 811
- 135 Salemink, P.J.M., Raué, H.A., Heerschap, A., Planta, R.J.,
Hilbers, C.W. (1981) Biochemistry 20, 265 - 272

- 136 Nichols, J.L., Welder, L. (1979) Biochim. Biophys. Acta 561, 445 - 451
- 137 Nishikawa, K., Takemura, S. (1977) J. Biochem. 81,
995 - 1003
- 138 Maruyama, S., Sugai, S. (1980) J. Biochem. 88, 151 - 158
- 139 Lightfoot, D.R., Wong, K.L., Kearns, D.R., Reid, B.R.,
Shulman, R.G. (1973) J. Mol. Biol. 78, 71 - 89
- 140 Geerdes, H.A.M., Hilbers, C.W. (1979) FEBS Letters 107,
125 - 128

LEBENS LAUF

9.7.1951	geboren in Singen a.H.
1958 - 1962	Besuch der Volksschule in Singen
1962 - 1970	Besuch des Gymnasiums in Singen, abgeschlossen am
11.6.1970	mit dem Zeugnis der Hochschulreife
1970 - 1977	Studium der Chemie an der Universität Freiburg
13.4.1973	Diplom - Chemiker - Vorprüfung
1976 - 1977	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Physikalische Chemie II der Universität Freiburg bei Prof. Dr. Th. Ackermann
2.5.1977	Diplom - Chemiker - Hauptprüfung
1977 - 1981	Anfertigung der Dissertation am Lehrstuhl für Physikalische Chemie II der Universität Freiburg bei Prof. Dr. Th. Ackermann
1976 - 1977	Wissenschaftliche Hilfskraft
seit 1977	Wissenschaftlicher Angestellter



D. GRÄBNER

DISSEKTATIONS- u. OPFERTAFELDRUCKEREI

Gotenstraße 3
9602 Altendorf bei Bamberg
Telefon: 09545 6791